

**Der Einfluß von DNS-interkalierenden Farbstoffen und
homologen Zellen auf das Hamstermelanom AMel 3**

Ein experimenteller Beitrag zur Behandlung des malignen Melanoms

Gabriele Stöß
—

1977
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0062

Aus der Dermatologischen Klinik der Universität München

Direktor Prof.Dr.O.Braun-Falco

Der Einfluß von DNS-interkalierenden Farbstoffen und homologen
Zellen auf das Hamstermelanom AMel 3.

Ein experimenteller Beitrag zur Behandlung des malignen Melanoms.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gabriele Stöß

aus
Aschau
1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.B.-R.Balda

Mitberichterstatter: Prof.Dr.O.Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 10. 1977



	Seite
1. Einführung	4
2. Maligne Melanome des Menschen	
2.1. Statistische Verteilung und Differentialdiagnose, Histogenese, Pathogenese und Ätiologie	5
2.2. Klinisches Bild und Histologie	8
2.3. Prognose	10
2.4. Therapie	11
3. Maligne Melanome des Hamsters	
3.1. Entstehung	20
3.2. "Klinisches Bild" und Histologie	20
3.3. Biochemische Untersuchungen	22
3.4. Therapeutische Studien	23
4. Eigene Experimente	
4.1. Material und Methoden	32
4.2. Vorversuch zur Immunisierung mit homologen Zellen	34
4.3. Orale Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid	36
4.4. Parenterale Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid	38
5. Diskussion der Ergebnisse	
5.1. Vorversuch zur Immunisierung mit homologen Zellen	43
5.2. Behandlung mit Proflavin und Ethidiumbromid	44
5.3. Vergleich mit Röntgen- und synzytostatischer Therapie	48
6. Zusammenfassung	51
7. Literaturverzeichnis	54
	- 65

1. Einführung

Um die Jahrhundertwende lag Krebs in der Todesursachenstatistik an achter, 1969 bereits an zweiter Stelle hinter den Herz- und Kreislaufkrankungen (13,25). Für einen Neugeborenen besteht demnach heute mit eins zu fünf die Möglichkeit, an Krebs zu sterben. Dieses Risiko scheint noch weiter zuzunehmen. Ob dafür der vermehrte Anfall karzinogener Noxen aus Rückständen der industriellen Produktion verantwortlich gemacht werden kann, ist eine spekulative Annahme, die weiterer Nachprüfungen und Beweise bedarf.

Bei den bösartigen Tumoren kann zwischen Karzinomen (etwa 95%) und Sarkomen (etwa 5%) unterschieden werden. Erstere gehen von den 18% epithelialen Geweben, letztere von den 82% Binde- und Stützgeweben des menschlichen Körpers aus (13). Mit 1-2% der Gesamtzahl sind die malignen Melanome in der Gruppe der Karzinome enthalten, obwohl sie entsprechend ihrem Ausgangsgewebe und biologischen Verhalten eine Sonderstellung einnehmen.

Maligne Melanome werden häufig verkannt, da sie jahre- und jahrzehntelang ohne Beeinträchtigung des Gesamtorganismus lokal als braunschwarze Flecken oder flache Knoten mit kaum merklichem Wachstum vorhanden sein können. Möglicherweise besteht über lange Zeit ein (immunologischer) Gleichgewichtszustand zwischen Tumorzellen und Wirtsorganismus. Dieser kann plötzlich zuungunsten des letzteren gestört werden (55). Das sich entwickelnde Melanom zeichnet sich dann durch rapides Wachstum und starke Metastasierungstendenz aus.

So beträgt die Fünfjahresüberlebensrate für frühe Stadien ohne weitere Aufschlüsselung nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium und histologischem Befund kaum 50%, für alle Stadien 10-30% (13,24,55).

2. Maligne Melanome des Menschen

2.1. Statistische Verteilung und Differentialdiagnose, Histogenese, Pathogenese und Ätiologie

Statistische Verteilung und Differentialdiagnose

In einer "über-alles-Statistik" gibt es hinsichtlich des am häufigsten betroffenen Lebensalters einen Gipfel im vierten und sechsten Lebensjahrzehnt. Nach einer Studie von Sinner (88) an 145 Patienten liegt das arithmetische Mittel bei 49,2 Jahren.

Männer und Frauen sind zahlenmäßig annähernd gleich betroffen, unterscheiden sich aber hinsichtlich Melanomtyp, dessen Lokalisation und Prognose. So zeigt sich das Lentigo-maligna-Melanom bevorzugt im Gesicht der Frauen (24,88). Insgesamt haben Frauen mit malignem Melanom eine relativ günstige Prognose (24, 88, 91).

Maligne Melanome metastasieren zu etwa 50% lymphogen und zu 11% hämatogen (88). Betroffen sind mit 43,1% besonders die regionären Lymphknoten, mit 40,1% die Haut, mit 18,9% die Lunge, mit 9,1% das Skelett, mit 6,8% das Gehirn, mit 6,8% die Leber und mit 0,7% die Pleura (88).

Die rasche Ausbreitung ist nach Miescher (70) bedingt durch den feingeweblichen Aufbau: Lockere Struktur und fehlende Kohärenz der den Kapillaren unmittelbar aufsitzenden Zellverbände, Gefäßreichtum und leichte Verletzbarkeit.

Bei der Vielzahl pigmentierter Hautveränderungen ist die Differentialdiagnose oft sehr schwer. Beispiele differentialdiagnostischer Überlegungen sind Angiom, Histiocytom, Nävus, Verruca, Glomustumor, Keratoakanthom, Neurofibrom, pigmentiertes Basaliom, Plattenepithelkarzinom, hypertrophischer Morbus Bowen, Lichen ruber verrucosus und Lupus vulgaris. Besonders schwierig ist die Abgrenzung einer Melanosis circumscripta praecancerosa (Dubreuilh) von einem initialen, oberflächlich spreitenden Melanom. Hinweise für eine maligne Transformation sind dabei mit

69,7% Proliferation, 13,5% Blutung, 12,1% Pigmentveränderungen (Dunkelung, Farbton der Pigmentation, Depigmentierung), 10,6% Ulzeration, 9,1% Schmerzen, 6,8% Jucken, 4,5% Sekretion, 3,8% Entzündung (mit Lymphangitis), 1,5% Krusten- und Schuppenbildung und Schwellung (88).

Histogenese, Pathogenese und Ätiologie

Heute wird angenommen, daß die den Melanozyten entsprechenden pigmentbildenden Zellen von der Neuralleiste auswandern (79) und möglicherweise in nävozytische und melanozytische Zellreihen zu unterscheiden sind (68). Aus beiden sollen Melanome entstehen können.

Die Entwicklung von Melanomen der Haut erfolgt in Auswertung der Patientenangaben auf dreifache Art: Auf unveränderter Haut je nach Autor (3,24) zwischen 5 und 25 %, auf Nävuszellnävi zu 31 % und auf dem Boden einer Melanosis circumscripta praecancerosa (Dubreuilh) zu 35 % (3). Die restlichen 27 % sind in der Regel anamnestisch nicht eruierbar.

Während chronische Traumen, auch aktinische Dauerbelastung (exponierte Lokalisation) die maligne Transformation von pigmentbildenden Zellen zu fördern scheinen, kommen familiäre, hormonale (Schwangerschaft) und genetisch determinierte immunologische Faktoren (fehlende Eigenschaft HL-A-5) als prädisponierende Momente in Frage (27).

Molekularbiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen maligner Melanome ergaben ähnlich wie bei Leukämien und Mammakarzinom Hinweise auf die ätiologische Beteiligung onkogener Viren. Seit in Primärtumoren und Metastasen die morphologische Darstellung von Virus-ähnlichen Partikeln und biochemisch deren Charakterisierung gelang (12,16,18,23), steht die Virusgenese im Mittelpunkt des Interesses.

Morphologisch läßt sich außerdem eine Ähnlichkeit von virusartigen Partikeln in tierischen und menschlichen Melanomen feststellen (12). Ihre Radspeichen-ähnliche Struktur gleicht - ist jedoch nicht identisch mit - jener von onkogenen RNS-Viren vom C-Typ (Oncorna-Viren). Sie haben einen Gesamtdurchmesser von 90-120 nm und besitzen einen elektronendichten Kern (Core), der von einer unterschiedlich strukturierten Hüllmembran (Envelop) umgeben wird.

Physikalische Untersuchungen zeigen, daß die Dichte für Virus-ähnliche Partikel $1,16-1,19 \text{ g/cm}^3$ im Saccharose-Dichtegradienten beträgt.

Biochemisch lassen sich aus dem Kern der Partikel eine hochmolekulare einsträngige RNS (70 S-RNS) und eine RNS-abhängige DNS-Polymerase nachweisen (12,87). Die 70 S-RNS entspricht dem genetischen Material. Mit Hilfe der DNS-Polymerase kann diese Information in DNS umgesetzt werden, weshalb dieses Enzym auch reverse Transkriptase genannt wird (4).

Abgesehen von den mehr spekulativen Annahmen über die "zufällige" Entstehung (47,92) onkogener RNS-Viren, scheint auch die Übertragung und Realisation ihrer genetischen Information sehr kompliziert zu sein. Diese Vorgänge sind nicht vergleichbar mit denen bei bekannten infektiösen Viren. Ob für die Übertragung ein erblicher (Onkogenetheorie, 58) oder ein infektiöser (Provirushypothese, 92) Weg in Frage kommt, ist gegenwärtig Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Höchstwahrscheinlich können aber beide Übertragungsmodi alternierend und synchron auftreten (4).

Zur Realisation der zusätzlichen genetischen Information kommt es meist durch weitere Einflüsse, wie UV-Strahlen, chemische Karzinogene oder andere Viren, denn primär dürften die viralen Gene durch wirtszelleigene Regulationsvorgänge reprimiert sein. Wird durch diese zusätzlichen Faktoren ein partieller (Onkogen) oder vollständiger (Provirus) Abruf der viralen genetischen Information ermöglicht, so ist über den anscheinend völlig normalen Transkriptions- und Translationsweg eine Zelltransformation möglich.

2.2. Klinisches Bild und Histologie

Das klinische Bild maligner Melanome ist sehr vielfältig. Deshalb ist, wie bereits erwähnt, die Abgrenzung gegenüber anderen Hauttumoren schwierig, und die mit 20 - 30 % (3,24) vergleichsweise hohe Zahl von Fehldiagnosen bei histologischer Nachkontrolle wird verständlich.

Auf Grund des klinischen und vor allem histologischen Bildes werden maligne Melanome nach Clark (27) in drei morphologisch, anamnestisch und verteilungsmäßig unterschiedliche Hauptformen eingeteilt, nämlich

das superfiziell spreitende Melanom,
das primär knotige Melanom und
das Lentigo-maligna-Melanom (Melanom auf Morbus Dubreuilh).

Das superfiziell spreitende Melanom tritt meist am Rumpf bei Menschen mittleren Lebensalters auf. Es kann sich auf unveränderter Haut oder aus einem Nävuszellnävus entwickeln. Die Anamnese läßt sich gewöhnlich über 1-5 Jahre zurückverfolgen. Der Herd ist flächig, rundlich, scharf begrenzt, hat oft zungenförmige Ausläufer, einen erhabenen Rand, ein von Braun über Grau bis Rot reichendes Farbspiel und kleine Knötchen. Histologisch imponieren polymorphe, rundliche, zytoplasmareiche und sogenannte pagetoide Zellen. Als "Melanoma in situ" liegen sie zuerst nur in der Epidermis, breiten sich aber später auch ins Korium aus (24, 46).

Das knotige Melanom wächst in Form halbkugeliger Knoten mit gleichmäßiger blauschwarzer und glatter Oberfläche. Menschen mittleren Lebensalters sind auch hierbei bevorzugt betroffen. Die Anamnese ist mit einigen Wochen bis maximal zwei Jahren deutlich kürzer als beim superfiziell spreitenden Melanom. Spindelige, epitheloide, polymorphe Tumorzellen haben eine von vornherein tiefenwärts orientierte Wachstumsrichtung (24, 45).

Das Lentigo-maligna-Melanom entwickelt sich auf der Melanosis circumscripta praecancerosa (Dubreuilh) mit Bevorzugung des höheren Lebensalters (sechstes Dezennium) und des weiblichen Geschlechts. Es entsteht fast ausschließlich in lichtexponierten Arealen (Gesicht, Unterschenkel). Die Anamnese ist über Jahrzehnte hinweg verfolgbar. Der zuerst sommersprossenartige, bräunliche Fleck wird beim Übergang in ein invasives Melanom stärker gescheckt, zeigt schwärzliche, leicht infiltrative Veränderungen oder kleine Knötchen, oft eine warzige, schuppige Oberfläche. Später können Erosionen, Blutung, Krustenbildung und Ulzeration hinzukommen. Bei histologischer Betrachtung erscheinen in der Basalzellschicht der Epidermis spindelförmige bis polymorphe, atypische melanocytenartige Zellen. Beim initialen Melanom scheinen sie ins Korium "abzutropfen" (24, 46).

Neben der Art des Tumors ist für das therapeutische Vorgehen und die prognostische Einschätzung das klinische Stadium entscheidend.

Stadium I : Primärtumor mit oder ohne Satellitenmetastasen in der Umgebung bis zu 5 cm.

Stadium II : Primärtumor und regionale Lymphknotenmetastasen oder/und Metastasen zwischen Primärtumor und regionalen Lymphknoten.

Stadium III: Primärtumor und mehr als zwei Lymphknotenmetastasengruppen und generalisierte Haut- beziehungsweise Organ-Metastasierung.

2.3. Prognose

Die prognostische Beurteilung hängt von mehreren Faktoren ab, so dem Lebensalter, Geschlecht, der Lokalisation, Flächen- und Tiefenausdehnung des Primärtumors und dessen histologischer Differenzierung.

Im mittleren Lebensalter treten Melanome häufiger auf, sind andererseits aber auch therapeutisch besser zu beeinflussen als im früheren oder höheren Lebensalter (24, 88). Für das weibliche Geschlecht besteht eine um 20 % größere Lebenserwartung, vielleicht wegen der selteneren Stammlokalisation und damit weniger bedrohlichen Metastasierungswege des Primärtumors (24, 91).

Während bei einem Geschwulstdurchmesser bis zu zwei Zentimetern die Fünfjahresüberlebensrate 63 % beträgt, erreicht sie bei über zwei Zentimetern nur die von 17 %. Erfasst die Invasionstiefe nur das Stratum papillare, werden fünf Jahre von 73 % Frauen und 52 % Männern überlebt, bei Einschluß des halben Korium von 55 % Frauen und 43 % Männern, bei "Abtropfen" von Melanomzellen ins Fettgewebe von 45 % Frauen und 16 % Männern (24).

Von den drei genannten Melanomtypen hat das Lentigo-maligna-Melanom (mit der längsten Anamnese) die deutlich günstigere Prognose gegenüber dem superfiziell spreitenden Melanom und besonders gegenüber dem knotigen Melanom.

Bei ihrer histologischen Differenzierung scheint weniger der Zelltyp (globoid-, gemischt- spindelzellig) einen Einfluß auf die Überlebenszeit zu haben als der Atypiegrad und Entzündungszustand (46).

2.4. Therapie

Die therapeutischen Maßnahmen können unterteilt werden in chirurgisches, chemotherapeutisches, immunotheapeutisches, röntgentherapeutisches Vorgehen und Kombinationen, wie chirurgischer Eingriff und Chemotherapie, chirurgischer Eingriff und Chemo-Immunotherapie, chirurgischer Eingriff und Röntgentherapie.

Je nach klinischem Stadium, histologischem Befund und Allgemeinbefinden des Patienten wird der therapeutische Weg eingeschlagen.

Chirurgisches Vorgehen

Die Vorrangstellung der primären operativen Versorgung maligner Melanome steht heute außer Zweifel (24, 86). In Vollnarkose werden Primärtumor und Metastasen großzügig mit einem dreidimensionalen Sicherheitsabstand von fünf Zentimetern vom Tumorrand unter Erhalt der Muskelfaszie exzidiert. Besondere topographische Gegebenheiten (Hände, Gesicht etc.), Alter oder Allgemeinbefinden des Patienten erfordern Abweichung von diesem Prinzip. Elektresektion sowie sofortige plastische Deckung des Operationsfeldes durch freie Hauttransplantation oder Verschiebeplastik sind heute allgemein akzeptiert (24, 45). Der Wert der prophylaktischen Lymphknotenentfernung ist wegen der Beeinträchtigung des Lymphabflusses und der immunologischen Funktion der Lymphknoten umstritten (24, 86).

Nach Radikaloperation und bei Bedarf späterer en-bloc-Lymphknotenentfernung werden von Scherer et al. (86) für Stadium I eine Fünfjahresüberlebensrate von 60 %, für Stadium II eine von 15 - 20 % angegeben.

In diesem Zusammenhang soll noch kurz das Problem der Probeexzision und der prophylaktischen Entfernung von Nävuszellnävi angesprochen werden. Die Probeexzision als reine Inzisionsbiopsie wird meist abgelehnt, obwohl ihre Metastasierungsbegünstigung umstritten ist (37). Die Exzisionsbiopsie mit dreidimensionalem Sicherheitsabstand von mindestens zwei Zentimetern und unmittelbar folgender Gefrierschnitt- (Kryostat-) Schnelldiagnose hat dagegen in Verdachtsfällen den Vorteil größerer diagnostischer Absicherung und Ungefährlichkeit, verbunden mit der Möglichkeit unverzüglicher Erweiterungsfähigkeit (24, 45).

Die Methode verdient Bevorzugung gegenüber einer Kombination von Inzisionsbiopsie und nachfolgender Röntgenbestrahlung. Letztere wird auch bei der eigentlichen Tumorexzision immer mehr vernachlässigt zugunsten einer Röntgenvorbestrahlung oder einer en-bloc-Vereisung (24, 45). Die nochmalige Belastung des Wundbettes mit energiereichen Strahlen fördert eher die Sklerosierung, Ödem- und Ulkuserwicklung, als daß sie die verbliebenen Tumorzellen an ihrer Reaktivierung oder Ausschwemmung hindert (90). Eine Röntgenvorbestrahlung soll dagegen die Zellen teilungsunfähig machen, so daß bei der Operation ausgeschwemmte Zellen nicht zu einer Metastasierung führen können. Die prophylaktische Exzision ruhender pigmentierter Nävuszellnävi an traumatisch exponierten Lokalisationen wird empfohlen (24, 45).

Chemotherapie

Zur Behandlung von klinisch fortgeschrittenen Tumorstadien oder als Kombination mit chirurgischer Intervention finden bei malignen Melanomen Chemotherapeutika Verwendung, wie etwa Vincristine, 1,3 bis (2-chloräthyl) -1-nitrosourea (BCNU), Cyclophosphamid, Amethopterin, das zytostatisch wirksame Antibiotikum Bleomycin sowie die Hormone Testosteron und Östradiol.

Wie alle Zytostatika greifen sie nicht nur spezifisch in den Stoffwechsel der Tumorzellen, sondern auch in den anderer Zellen ein. Überzeugende Behandlungsergebnisse werden von den Autoren jedoch nicht vorgebracht (24,28,50,67,69,78,85). Einen Fortschritt in der chemotherapeutischen Behandlung scheint 5-(3,3-dimethyl-1-1triazeno) Imidazol-4-carboxamid (DTIC) darzustellen (52). Seine Hauptwirkung zeigt es in der postsynthetischen Ruhepause des Mitosezyklus. Es bewirkt außerdem eine mäßig starke Knochenmarkdepression und oft ausgeprägte subjektive Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen (28, 85). Systemisch verabreicht konnte eine Tumorrückbildung in 19 %, bei Konzentrationssteigerung, jedoch damit verbundener größerer hämatologischer Toxizität, eine in 35 % der Fälle erreicht werden. Intraarteriell appliziert bewirkte DTIC in 20 % der Fälle Remission bei Patienten mit disseminiertem malignen Melanom (85).

In Kombination mit dem Vincaalkaloid Vincristin, das die Metaphase durch Störung des Uridineinbaus in lösliche RNS-Fraktionen behindert, wurde mit DTIC in 27-45 % der Behandelten eine Rückbildung der Metastasen bei malignen Melanomen erzielt (28).

BCNU diffundiert als fettlösliches Zytostatikum schnell ins Gewebe. Deshalb wurde es für eine Dreifachkombination von DTIC, Vincristin und BCNU verwendet (28). Die Ergebnisse werden nicht einheitlich beurteilt. Während von Cohen et al. (28) eine Erfolgsziffer von 62 % kompletter bzw. Teilremissionen von Primärtumor, Haut-, Lymphknoten- und Lungenmetastasen genannt werden, geben McGovern und Russel (50) sowie Primack et al. (78) einen nur 13%igen bzw. 16-25%igen Rückbildungserfolg an.

Cyclophosphamid, Amethopterin, Bleomycin und die gegenschlechtliche hormonelle Beeinflussung mit Testosteron bzw. Östradiol haben sich nicht bewährt (24, 67,69).

Immunotherapeutische Maßnahmen

Das Vorhandensein einer spezifischen zellulären Immunabwehr ist bei malignen Melanomen mit Hilfe verschiedener Techniken (Immunfluoreszenzmikroskopie, Zytotoxizitätstest, Komplementbindungsreaktion) häufig bestätigt worden (24, 72, 75, 99).

Die Immunotherapie kann aktiv, passiv oder unspezifisch sein.

Bei der aktiven Immunotherapie werden Tumorantigene zugeführt, die eine Stimulation der Antikörperproduktion hervorrufen sollen. Technisch werden folgende Wege eingeschlagen: Da gereinigte und stabilisierte spezifische Tumorantigene noch nicht vorliegen, wird ein Impfstoff aus menschlichen Melanomzellen von frischem Operationsmaterial hergestellt. Durch Bestrahlung mit 5000 - 12000 R (60) oder Vorbehandlung mit Mitomycin C (15) werden die Zellen teilungsunfähig gemacht. Ein Impfstoff mit gesteigerter Immunogenität kann durch Koppelung von Melanomzellen mit einer für sich schon stark immunogenen Substanz, wie Kaninchen-Gammaglobulin oder Ziegen-Gammaglobulin (konjugierte Autovakzine) gewonnen werden (15). Eine weitere Möglichkeit einer Antigenpotenzierung ist die Vorbehandlung von Melanomzellen mit Neuraminidase. Durch das Enzym sollen Antigendeterminanten an der Zelloberfläche, die durch humorale Antikörper blockiert sind, freigelegt werden. Der Angriff immunkompetenter Lymphozyten soll dadurch erleichtert werden (15).

Ziel der passiven Immunisierung ist die Zufuhr melanomspezifischer Antikörper. Sie kann mit Immun-Sera, Immunzellen oder sogenannten Transferfaktoren durchgeführt werden (15). Tierische Immunsera erwiesen sich als nicht geeignet für menschliche Zellen und Gewebe. Menschliche Immunsera müssen genügend zytotoxisch aktiv sein und sollen keine blockierenden

Antikörper enthalten, da sie sonst unwirksam sind und lediglich zum Ausfall von Immunkomplexen führen können (15). Die Kultivierung von Lymphozyten mit Melanomzellantigenen soll durch Sensibilisierung die Zahl der Effektorzellen erhöhen (15). Als sogenannter Transferfaktor wird eine aktive Fraktion aus sensibilisierten Lymphozyten ("Immun-RNS") bezeichnet. In vitro können RNS-Extrakte peripherer Blutlymphozyten von "geheilten" Melanompatienten normale allogene Lymphozyten zu zytotoxischem Verhalten gegen Melanomzellen induzieren (15). Außerdem scheint die Tumorspezifität dieser Immun-RNS nicht artgebunden zu sein, wie Versuche mit heterologen Lymphozyten zeigten (15).

Die unspezifische Immunotherapie wurde bereits früher bei verschiedenen Erkrankungen als "unspezifische Reizkörpertherapie" durchgeführt. Beabsichtigt ist eine allgemeine Stimulierung des immunologischen Abwehrapparates.

Anwendung in der Praxis fanden zum Beispiel die Zellulartherapie nach Niehans, die Injektion von Pflanzenextrakten, bakteriellen Proteinen und Lipiden (15). Heute werden als Immunstimulantien lebende oder abgetötete Mycobakterien (zum Beispiel als BCG-Impfstoff mit oder ohne Freund's Adjuvans), Vaccinia-Virus und das Ekzematogen Dinitrochlorbenzol (DNCB) verwendet (15). Die immunpotenzierenden Verbindungen werden meist lokal durch intranoduläre (intratumorale) Injektion oder Skarifikation appliziert. Histologische Kontrollen lassen eine Infiltration lymphohistiozytärer Zellen und eine sukzessive Elimination der Tumorzellen erkennen (15). Einen anderen Wirkmechanismus zeigt die systemische Anwendung unspezifischer Immunstimulantien, zu denen neben BCG-Vakzine zum Beispiel auch *Corynebacterium parvum* zählt. Durch sie ist eine Aktivierung der Funktionen von Makrophagen und die Steigerung humoraler und zellulärer Immunreaktionen gegenüber den verschiedensten Antigenen,

darunter auch gegen tumorspezifische Tumorantigene nachweisbar. Der Umfang dieser Antikörperpotenzierung ist weitgehend abhängig von der Immunkapazität des Tumorträger (15). Wenngleich theoretisch diese Behandlungsmaßnahmen gut begründet werden können, so ist in der Praxis doch mit vielen Schwierigkeiten zu rechnen und Erfolge sind nicht immer eindeutig belegt.

Bevorzugte Anwendung findet die Immunotherapie bei fortgeschrittenen Tumorstadien (II und III), hier allerdings mit einem etwas besseren Erfolg als die rein chirurgische Intervention (15,36,50,60). Nach Bilber et al. (36) konnte zum Beispiel die trotz laufender operativer Eingriffe bei 80 % der Patienten auftretende Lymphknoten- beziehungsweise generelle Metastasierung durch postoperative BCG-Immunotherapie auf die Hälfte verringert werden. Der Behandlungserfolg zeigte sich abhängig von der Tumorgroße bei der primären chirurgischen Intervention und von der Zahl mikroskopisch oder makroskopisch nachgewiesener Lymphknotenmetastasen. Die Rezidivneigung wurde ebenfalls deutlich vermindert.

Röntgenbehandlung

Eine alleinige röntgenologische Behandlung der malignen Melanome stand früher gleichwertig neben dem chirurgischen Eingriff. Auch heute hat sie bei inoperablen, meist fortgeschrittenen Tumorstadien ihren berechtigten Platz. Von verschiedenen Autoren ist jedoch immer wieder eine relative Strahlenresistenz der malignen Melanome hervorgehoben worden. Sie gründet sich auf die Möglichkeit des Auswachsens melaninbildender Zellen in der Gewebekultur, nach dem der Tumor fraktioniert bis insgesamt 12 000 R beziehungsweise einzeitig mit 15 000 R bestrahlt wurde und sich klinisch zurückbildete (83). Erst bei Gesamtdosen von 22 500 R wurde eine Lebensfähigkeit der Zellen ausgeschlossen. In der letzten Zeit sind allerdings Zweifel an der Richtigkeit dieser Angaben geäußert worden (66).

Miescher (70) erreichte 1957 mit fraktionierter Bestrahlung von 300-700 R Einzeldosen bis insgesamt 5000-8000 R Gesamtdosis eine Fünfjahresüberlebensrate einschließlich Symptomfreiheit von 69 % für das Stadium I. Sie belief sich vergleichsweise für primäre Exzision mit Nachbestrahlung auf 60 %, für primäre Koagulation mit und ohne Nachbestrahlung auf 85,7 %. Damals stellte er fest, daß Melanomalignome zu einem hohen Prozentsatz heilbar wären - abhängig vom frühzeitigen Eingreifen vor einer möglichen Metastasierung - , daß radiologisches und chirurgisches Vorgehen gleich gut seien und in schwierigen Fällen auch eine Gemeinschaftsaufgabe darstellen sollten.

Hinsichtlich der Fünfjahresüberlebensrate decken sich die Erfolgsziffern einiger anderer Autoren, wie Hellriegel (56,57), Sinner (88), Rhode und Wiskemann (83), Piller (76), Cascinelli und Pilotti (36), mit denen von Miescher (70): Bei Bestrahlung des Tumors einschließlich regionärer Lymphknoten mit insgesamt 8000-12000 R sind Überlebensraten von durchschnittlich 50-70 % möglich.

Die modernen Megavoltanlagen, zum Beispiel Großapparate (Betatron, Gammatron) mit Maximalenergien bis zu 40 MeV, ermöglichen exaktere Dosierung der Strahlung durch Strahlenbündelung und definierte Bestrahlungstiefe. Die Tumorumgebung, insbesondere die Lymphabflußwege, werden dadurch geschont, Sklerosierung, De- und Hyperpigmentation, Hautatrophie, Epilation, Thrombosierung, Ödem- und Ulkusbildung treten in weitaus geringerem Umfang auf.

Durch die primär kurzzeitige hochdosierte Bestrahlung mit schnellen Elektronen bis 15 MeV (6000 R Herddosis, in 5-6 Wochen verabreicht) und anschließender Elektroresektion des Resttumors konnte Becker (14) bei insgesamt 295 Fällen eine Erfolgsquote von 71,3 % für Stadium I, eine von 21 % für Stadium II erreichen.

Eine andere Möglichkeit radiologischer Beeinflussung des Melanomwachstums stellt die selektive aktive und passive Anreicherung von Radioisotopen in Form der heißen endolymphatischen Therapie dar (24, 86, 95). Radioaktiver Phosphor, zum Beispiel als ^{32}P -Lipidol, soll sich nach endolymphatischer Applikation in möglichen Lymphknotenmetastasen anreichern, um dort die Tumorzellen zu vernichten (24, 86, 95).

Kombinationsbehandlung

Jede der oben erwähnten therapeutischen Maßnahmen für sich alleine stellt einen Eingriff nicht nur gegenüber den Tumorzellen, sondern auch gegenüber dem Gesamtorganismus dar. Ziel der Kombinationsbehandlung ist es, durch verschiedene Maßnahmen eine Streuung der Nebenwirkungen auf mehrere Organsysteme zu erreichen und gleichzeitig die Effektivität gegenüber dem Tumor durch Schädigung in mehreren Stoffwechselbereichen zu steigern.

Die klassische Kombinationsbehandlung war die chirurgisch-röntgenologische. Durch Vor- beziehungsweise Nachbestrahlung versucht man das Operationsfeld klein zu halten und die Tumorzellen bis zur teilweisen Inaktivierung ihrer Zellteilungsfähigkeit mäßig hoch zu bestrahlen.

Die besonders bei fortgeschrittenen Tumorstadien angewandte (Poly-) Chemotherapie soll nach primär chirurgischer Intervention die Metastasierungstendenz verlangsamen, hat aber nachteilige Auswirkungen auf fast alle Organe, besonders auf stoffwechsel- und mitoseaktive Zellsysteme.

Wegen der immunsuppressiven Wirksamkeit von Zytostatika wird heute ergänzend zu dem chirurgischen Eingriff und der Chemotherapie meist noch immunstimulierend behandelt (52). Durch intravenöse Gabe von DTIC und Skarifikation mit BCG erzielten Guterman et al. (52) bei disseminierten malignen Melanomen eine 55%ige Rückbildungsrate gegenüber der Kontrollgruppe.

Ammon und zum Winkel (1) zeigten anhand folgender Versuche die Möglichkeit einer röntgenologisch-chemotherapeutischen Kombinationsbehandlung. Mit Cyclophosphamid kann der Teilungszyklus von Säugetierzellen bereits in der G_2 -Phase gehemmt werden. Durch diese Blockade werden in der darauffolgenden Röntgenbestrahlung vermehrt die strahlensensiblen Phasen G_1 bis S und G_2 -Phase erreicht.

Mit dem Purinantagonisten 5-Fluorourazil wird der Übergang von G_1 -Phase bis S-Phase nachhaltig gebremst. Den Patienten innerhalb 12 Stunden infundiert, gekoppelt mit einer Bestrahlung des Tumors beziehungsweise dessen Rezidiv nach der notwendigen achtstündigen Blockadezeit mit 400-500 R und nach 18maliger Durchführung insgesamt 6000 R, zeigte es bei klinischer Anwendung an malignen Melanomen gute lokale Rückbildungserfolge (1).

Maligne Melanome sind - wie dargestellt - sowohl in biologischer als auch in therapeutischer Hinsicht besondere Tumoren. Die Vielfalt der angegebenen therapeutischen Verfahren ist Ausdruck des schwer zu beeinflussenden klinischen Verlaufs.

Um Ätiologie, Pathogenese und vor allem die Therapie menschlicher Melanome untersuchen zu können, werden deshalb gerne Versuchstiere mit experimentell transplantierbaren Tumoren herangezogen. Sie stellen eine biologische Einheit dar mit der Möglichkeit vielseitiger Handhabung - im Gegensatz zu Zellkulturen. Standardisierte Bedingungen, unter denen die Tiere gehalten werden, garantieren gleichbleibende ökologische Faktoren, die die Uneinheitlichkeit hinsichtlich Aussehen, Struktur, Wachstumstendenz und Therapie-resistenz reduzieren helfen. Ebenso unabdingbar sind sie auch für die Erzeugung der Tumoren mit Hilfe definierter Zelltransplantationen, Übertragung subzellulärer Fraktionen, chemischer Karzinogene sowie ionisierender Strahlen.

Wir wollten mit der Untersuchung der Beeinflußbarkeit des Hamstermelanoms - als einem besonders guten Modell für das menschliche maligne Melanom - durch homologe Zellen, die Farbstoffe Proflavin und Ethidiumbromid sowie durch deren radiomimetische Wirkung in Kombination mit Röntgenstrahlen einen Beitrag zur Behandlung des malignen Melanoms leisten.

3. Maligne Melanome des Hamsters

3.1. Entstehung

Als geeignetes Modell für maligne Melanome des Menschen stellt sich das Hamstermelanom AMel 3 von Fortner dar, denn seine Größe, mikroskopisches Erscheinen, Histogenese und biologisches Verhalten sind mit dem menschlichen Melanom vergleichbar (42). Fortner (41) entdeckte 1957 maligne Melanome bei syrischen Goldhamstern, teils als spontane Neubildung, teils induziert durch chemische Karzinogene. Im Laufe mehrerer Tierpassagen traten auch depigmentierte Areale auf. Sie erschienen etwas entdifferenzierter, waren jedoch Dopa-positiv und histologisch den pigmentierten Arealen ähnlich. Ihre Wachstumsrate war gesteigert und sie metastasierten eher in die regionären und entfernten Lymphknoten, besonders die der Lunge. Eine Zunahme heterologer Transplantabilität war ihnen eigen. Dem unpigmentierten Zelltyp entsprechend nannte Fortner diese Art maligner Hamstermelanome amelanotische Melanome (AMel), während er die Pigment-bildende Linie als melanotische Melanome bezeichnete (MMel) (41, 42, 51). Für die Transplantation von Tumoren ist nach Balda (3), Wohlrab und Peker (96) eine Tumorzellzahl von 10^6 am günstigsten, da nicht nur Veränderungen im Tumorwachstum am auffälligsten in Erscheinung treten, sondern da Befunde in diesem Bereich auch den geringsten Fehler aufweisen würden. Außerdem wurden auch zellfreie Partikel erfolgreich für eine Weiterübertragung verwendet (10, 22).

3.2. "Klinisches Bild" und Histologie

Fortner's amelanotisches Melanom AMel 3 des Hamsters ist nach subkutaner Übertragung klinisch als derbe, verschiebliche Hervorwölbung unter dem Fell zu tasten.

Mikroskopisch erscheint es nach Exzision im Anfangsstadium als abgekapseltes, einheitliches, rundliches Gebilde mit heller, glasig schimmernder, kompakter Außenschicht und innerem Gefäßstamm. Im späteren invasiven Stadium lösen sich die Außenkonturen auf und die zentrale Nekrose um den Gefäßstamm dehnt sich mehr und mehr zur Peripherie aus unter Einschmelzung des eigentlichen Tumorgewebes.

Lichtmikroskopisch fallen eine hinsichtlich Größe, Form, Dichte und Struktur eklatante Zell- und Kernpolymorphie auf (3, 6, 98). Die melaninfreien Zellen mit häufigen und atypischen Mitosefiguren sind in Läppchen angeordnet und infiltrieren das umgebende Bindegewebe und die Muskulatur. Stärker zelluläre Stromareaktion ist nicht zu beobachten. Zentral erscheinen Nekroseherde.

Elektronenmikroskopisch wird die Zellpolymorphie in Ausprägung von großen, ovoiden, langgestreckten, polygonal unregelmäßigen, bizarr geformten, stark gelappten, mit unregelmäßigen Aus- und Einstülpungen der Zellmembran oder richtigen Zellfortsätzen behafteten Formvarianten deutlich sichtbar (98). Interzelluläre Trennung der verzahnten oder gruppierten Zellen erfolgt durch schmale Kollagenzüge, aber keine größeren Gefäß- und Bindegewebssepten. Das Karyoplasma ist homogen. Stets mehrere Nukleolen und große Poren in der Kernmembran sind Ausdruck einer regen Stoffwechseltätigkeit. Letztere prägt sich auch aus in den zahlreichen, nicht durch Membranbindung aggregierten, sondern frei im Zytoplasma liegenden Ribosomen. Die für den Energieverbrauch maßgeblichen Mitochondrien sind vielfach vorhanden in variabler Form (ovoid, gelappt, ringförmig) und hohem Cristäabstand, zum Teil auch aggregiert in paranukleären Arealen in der Nähe des Golgi-Apparates. Dieses Membran- und Zisternensystem zeigt keine Anzeichen einer Melaninsynthese der Zelle, also weder Melanosomen noch Prämelanosomen. Stäubli et al. (89) sehen dagegen eine "dichte Substanz" in den zum Golgi-Apparat gehörenden Vakuolen als mögliches Promelanin an. Zellen mit diesen Strukturen bezeichneten sie als amelanotische Melanozyten.

Eine zweite Art unterschied sich durch ihren Reichtum an Ribonukleoproteingranula und ihre Armut an Zellorganellen und Pigmentvorstufen. Zwei Zelltypen wurden auch von Wolff et al. (98) gefunden. Sie gaben Zellen mit Ribosomenanhäufungen an und solche mit besonders zahlreichen Mitochondrien, Golgi-Komplexen und granulärem endoplasmatischem Retikulum. Ob deren mehr vakuolige oder membranöse Struktur sich eventuell auf Zellalterung zurückführen läßt, kann nicht sicher gesagt werden. Das granuläre endoplasmatische Retikulum weist enge Beziehung sowohl zur äußeren Kernmembran wie auch zu Mitochondrien auf und beherbergt innerhalb seiner Zisternen gehäuft Virus-ähnliche Partikel (7). Diese können außerdem noch frei im Zytoplasma und wahrscheinlich auch in Mitochondrien gefunden werden. In einem pigmentierten Tiermelanom beschrieben früher schon Epstein et al. (38) in jeder geprüften Transplantationsgeneration derartige Teilchen mit Radspeichenstruktur. Morphologisch ähneln sie den beim Menschen gefundenen Partikeln. Ihre absolute Reindarstellung gelang bisher noch nicht, jedoch können mit subzellulären Fraktionen, in denen sie angereichert sind, Melanome im Tierexperiment übertragen werden (10, 22).

3.3. Biochemische Untersuchungen

Durch biochemische Untersuchungen werden eine Reihe von Stoffwechselbesonderheiten maligner Hamstermelanome aufgeklärt (9). Ganz allgemein besitzen diese keinen Gärungsstoffwechsel, sondern sind hinsichtlich Cytochromoxydase- und mitochondrialer ATPase-Aktivität qualitativ normal. Der DNS-Gehalt der Tumormitochondrien korreliert mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren und ist 15-20 mal so hoch wie in Hamsterlebermitochondrien, die vergleichsweise für normale Zellen

herangezogen werden (9). Entsprechend ist auch die Präkursoraufnahme um das sechs- bis achtfache gesteigert. Parallel zum erhöhten DNS-Umsatz findet sich eine Störung der RNS- und Proteinsynthese: Radioaktiv markierte RNS-Vorläufer werden in viel beträchtlicherem Ausmaß in Melanom- als Lebermitochondrien aufgenommen. Ebenso ist die Synthese eines für die Mitochondrienmembran typischen Proteins verringert und zusätzliche, Proflavin-hemmbar Proteinbanden lassen sich elektrophoretisch darstellen (8, 9).

In subzellulären Fraktionen kann eine Partikel-gebundene RNS-gesteuerte DNS-Polymerase (reverse Transkriptase) und eine einsträngige hochmolekulare RNS (70 S-RNS) nachgewiesen werden (10). Molekulare Nukleinsäurehybridisierungen zeigen Ähnlichkeiten zwischen tierischer und menschlicher partikelgebundener RNS (10).

3.4 Therapeutische Studien

Das maligne Hamstermelanom AMel 3 ist nicht nur hinsichtlich Morphologie, Wachstumseigenschaften und Metastasierungsverhalten ein vergleichbares Modell für menschliche maligne Melanome, sondern auch bezüglich seiner therapeutischen Beeinflussbarkeit. Folgende Behandlungsmethoden wurden an ihm untersucht: Operative Entfernung, chemotherapeutische, immunotherapeutische, röntgentherapeutische Maßnahmen und die Kombination von röntgenologischen und chemotherapeutischem Vorgehen.

Operation

In sehr naher Beziehung zur Praxis der derzeitigen operativen Behandlung des malignen Melanoms des Menschen untersuchten Haneke et al. (53) diese Behandlungsmethode am melanotischen Hamstermelanom. Trotz radikaler Exzision konnten nur 3 von 16 Tieren rezidivfrei gehalten werden. Die Lebensdauer aller operierten Tiere war dafür deutlich verlängert.

Eine Kombination von chirurgischer Behandlung und Chemotherapie mit Vincalucoblastine^R (VLB) erwies sich wegen der ungünstigen Wirkung dieser Substanz als nicht eindeutig positiv genug (53). Das Alkaloid VLB stoppt die Zellteilung in der Metaphase und wirkt wahrscheinlich nicht primär tumorspezifisch, sondern nur sekundär, bedingt durch die höhere Zellteilungsrate.

Chemotherapie

Eine chemotherapeutische Beeinflussung maligner Hamstermelanome wurde mit verschiedenen Substanzen versucht, so mit Mitosehemmern, Antimetaboliten, Antibiotika und Hormonen (13), darüber hinaus liegen weitere Studien vor (3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 17, 19, 20, 21, 31, 35, 84).

Das pigmentierte Analogon zum Hamstermelanom AMel 3, das Hamstermelanom AMel 1 von Fortner, sprach auf die alkylierenden Substanzen Thio-Tepa^R und Cyclophosphamid nicht selektiv an (84).

Hormonelle Einflüsse spielen offensichtlich bereits beim Entstehen der Hamstermelanome eine Rolle (41), denn transplantierbare melanotische und amelanotische Tumorzellen zeigen in vivo ein rascheres und eher letales Wachstum bei weiblichen als bei männlichen Tieren (67). In vitro kann das Wachsen von melanotischen Zellen durch Testosteron, wenig

durch Östradiol gehemmt werden. Andere Angriffsmöglichkeiten suchte man mit einer Sauerstoffüberdrucktherapie zu finden. Am Hamstermelanom AMel 4, das sich als besonders aggressiv und rapid metastasierend zeigt, konnte durch die physikochemische Wirkung dieser Behandlungsmethode die Manifestation von Lungenmetastasen verhindert und der Tod der Tiere hinausgezögert werden (31). Vasoaktive Pharmaka (z.B. Vasopressin und Arterenol) vermochten die Gewebsperfusion und Verteilung von Chemotherapeutika am transplantierten Tumor AMel 3 erheblich zu beeinflussen (35).

Der Akridinfarbstoff Proflavin kann mit DNS einen Komplex bilden (30, 59, 62, 63, 64, 80). Er wurde mit dem Modell eines "Sandwich" verglichen, weil sich Proflavin quer zwischen zwei benachbarte Basenpaare des DNS-Doppelstrangs einlagert (64). Bei der chemotherapeutischen Anwendung des Proflavin an Hamstermelanomzellen des AMel 3 zeigt sich in vitro eine Hemmung des mitochondrialen Tumor-Nukleinsäure-Metabolismus. Möglicherweise wird auch die reverse Transkriptase direkt gehemmt (10). Im Transplantationsversuch kann durch Zugabe von 2,5 mg Proflavin zu einer subzellulären Fraktion mit angereicherten Virusähnlichen Partikeln bzw. 4 mg Proflavin zur Zellsuspension ein Angehen des Hamstermelanoms komplett aufgehoben werden (12, 22). Dieser Effekt kann bei einer Tagesdosis vom 30 mg/kg Körpergewicht und parenterale Applikation auch in vivo bestätigt werden (20). Sehr hohe Konzentrationen, etwa 100 mg/kg Körpergewicht, führen dagegen bei den Tieren zu einer rapiden Abnahme aller Stoffwechselfunktionen der Leberzellen und zum raschen Tod (5).

Einen dem Proflavin ähnlichen Angriffsmechanismus zeigt der Phenanthridinfarbstoff Ethidiumbromid. Auch er besitzt eine starke Affinität zu kurzen, zirkulären, doppelsträngigen Polynukleotidketten und hemmt deren Transkription bevorzugt (81). Folge des Ethidiumbromid-DNS-Komplexes besteht nach

Richardson (80) in einer Blockade der Nukleinsäurekettenanfänge und bei höherer Konzentration auch in ihrer Kettenverlängerung. In Virus-transformierten Zellen behindert Ethidiumbromid selektiv die reverse Transkriptase und damit die Übertragung viraler auf zelleigene Geninformation (11). Der andere wesentliche Angriffspunkt liegt in einer festen Bindung an t-RNS, wodurch möglicherweise deren Ablösung von den Ribosomen erschwert wird, so daß der Eindruck sogenannter eingefrorener Ribosomen entsteht (11). An Zellen des Hamstermelanoms AMel 3 konnte Ethidiumbromid die in-vitro-RNS-Synthese erheblich, an Leberzellen derselben Tiere jedoch kaum beeinflussen (19). Die um 88 % geringere in-vivo-Synthese hochmolekularer RNS auf Grund intraperitoneal injizierten Ethidiumbromids zeigte sich an der verzögerten Tritium-markierten Uridininkorporation (18,21). In vivo kann durch Ethidiumbromid außerdem die mitochondriale Proteinsynthese in den Tumoren gehemmt werden (19). Dieser Effekt wurde auch anderweitig bestätigt, so in Hefen (49) und HeLa-Zellen (100).

Die Fähigkeit, mit DNS zu interkalieren, besitzt auch das Antibiotikum Actinomycin D (71,81). Experimentell kann mit Actinomycin D die zelluläre RNS- und Proteinsynthese gehemmt werden (9).

Immunotherapie

Ähnlich den eingangs erwähnten immunotherapeutischen Behandlungsprinzipien beim Menschen wurden die Möglichkeiten einer aktiven, passiven oder unspezifischen Immunotherapie auch bei Tiermelanomen untersucht (32, 34, 40, 48, 61, 84).

Als Beispiele für eine Kombination von unspezifischer Immunotherapie und Chemotherapie sollen die Kombinationsbehandlungen mit Clostridium-butyricum-Sporen, Cyclophosphamid und Prednisolon genannt werden. Am Melanom AMel 3 des syrischen Goldhamsters

wurde unter diesen Maßnahmen eine verlängerte Überlebenszeit beobachtet (61). Die spezifischen Antikörpertiter gegen Melanomgewebe stiegen an (61). Der Wirkungsmechanismus der Clostridien-sporen wird in der Stimulierung der humoralen und zellulären Immunabwehr vermutet, verbunden mit einer Lyse des Tumorzentrums (61). Cyclophosphamid und Prednisolon entfalten ihr Wirkungsoptimum im gut vaskularisierten Randgebiet (61).

Ein anderes Modellsystem sind Mäusemelanome. Durch mehrmalige Gabe von BCG (jeweils 1×10^8 lebende Bakterien, subkutan am ersten, intramuskulär am siebten, intraperitoneal am 21. und 35. Tag) konnte das Angehen der am 42. Tag überimpften Tumorzellen erheblich verzögert werden (40).

Eine spezifische aktive Immunisierung gegen das Hamstermelanom MMel 1 durch zwei- bis dreimalige Impfung 3-5 Monate alter Tiere mit Antigen-kompetenten Tumorzellen konnte nicht sicher nachgewiesen werden (84).

Eine passive Immunisierung als intraperitoneale Injektion eines Serums melanotischer Hamster oder Meerschweinchen mißlang (84).

Für den Effekt einer aktiven Immunisierung scheint der Zeitpunkt der Immunisierung von entscheidender Bedeutung zu sein. So führte die einmalige Impfung neugeborener Hamster mit intakten Simian 40- (SV 40-) Viren zu starker Tumorentwicklung (32). Die Viren wurden aus Affennieren-Zellkulturen oder solchen von menschlichem embryonalen Lungengewebe isoliert und bildeten - ähnlich Adenovirus Typ 12 und Polyoma-Virus - nach subkutaner Injektion in die Rückenhaut der Versuchstiere undifferenzierte Neoplasmen (32). Die Latenzperiode, das heißt die Zeit bis zum ersten Auftreten der Tumoren, war dabei sehr kurz (32). Eine zweite Impfung in der Mitte der Latenzperiode brachte dagegen eine wesentliche Verzögerung der Tumorbildung mit sich. Ebenso entwickelten erwachsene Hamster, die erst als solche infiziert wurden, eine Resistenz gegen die einige Tage später nochmals überimpften Viren (32). Die gebildete Immunität zeigte sich spezifisch für SV 40-Virus, Adenovirus Typ 12 und Polyoma-Virus. Die Möglichkeit einer zunehmenden Resistenzbildung wird deutlich bei einer Erhöhung der Zahl von Einzelinfektionen während der Latenzzeit. Nach 13facher Gabe, zweimal pro Woche, von Adenovirus Typ 12

und SV 40-Virus konnte die Tumorentwicklung verhindert werden in einem Ausmaß, das sich als umgekehrt proportional zur Anfangsinfektionsdosis sowie als direkt proportional zur Gesamtbehandlungsdosis erwies (34). Der Erfolg der aktiven Immunisierung war an intakte Viren gebunden, wie durch Degeneration der Viren in MgCl (50°, eine Stunde) gezeigt werden konnte (34).

Interessant sind sowohl die Wirkungen von Zytostatika (82) als auch von Bestrahlungen (48) auf das antigene Verhalten von Tumorzellen. Eine Beeinträchtigung der Teilungsfähigkeit von Tumorzellen mit ionisierenden Strahlen gelingt bei einer in-vitro-Zellsuspension von SV 40-Virus-induzierten Tumorzellen mit 2000 - 3000 R, in vivo mit 3000 - 4000 R. Wenn aus dermaßen vorbehandelten Tumorzellen in ihrer Antigenität veränderte Viren isoliert und zur aktiven Immunisierung gegen homologe Tumoren verwendet werden, zeigt sich ein der Bestrahlungsmenge proportional geringerer Immunitätsschutz als bei Injektion intakter Viren (48).

Röntgentherapie

Die wesentlichen molekularbiologischen Angriffspunkte ionisierender Strahlen sind DNS und RNS, in geringerem Maße wohl auch Proteine (44). Physikalisch gesehen kommt es zu einer Depolarisation von Röntgenquanten in vitro wie in vivo (44). Dadurch ändert sich das Energieniveau von Einzelatomen und Molekülen, was zu Brüchen im Nukleinsäurestrang führt. Dabei brechen zuerst einsträngige Nukleinsäuremoleküle vor den stabileren doppelsträngigen. Beweise dafür wurden durch Abnahme der Viskosität, des Molekulargewichtes sowie Auftrennung der Bruchstücke in der Zentrifuge und ihre unterschiedlichen Lichtspektren sowohl bei bakterieller als auch viraler DNS und RNS erbracht (44).

Von einem direkten Angriff an den Nukleinsäuren und deren Vorstufen kann ein indirekter durch Bildung von Peroxiden und Radikalen unterschieden werden. Letztere entstehen aus Wasser (kurzlebige) oder organischen Verbindungen (langlebige). Möglicherweise beruht auf ihrer Bildung die Strahlenempfindlichkeit sauerstoffabhängiger Tumorzellen.

Das Resultat der ionisierenden Strahlen ist eine durch die teilweise Inaktivierung der DNS verhinderte oder fehlerhafte identische Reduplikation des genetischen Materials. Dieser Effekt ist bei malignen Tumorzellen erwünscht, da er zu ihrer Inaktivierung bzw. Zerstörung führt.

Wie Untersuchungen in der Gewebekultur und Transplantationsversuche zeigen, bedarf es dazu einer verhältnismäßig hohen Röntgendosis (84).

Eine dosisabhängige Verlängerung der Inkubationszeit (bis zum Angehen der transplantierten Tumoren) zeigt die in-vitro-Bestrahlung frisch gewonnenen Gewebes vom Hamstermelanom MMel 1 mit 600, 3000 und 4500 R (84). Nach 4500 R gehen einzelne Tumoren nicht mehr an, erst recht nicht nach 6000, 12 000 oder 15 000 R. Hier scheint die Zellschädigung irreversibel zu sein (84).

Vergleichsweise strahlenresistent scheint das Harding-Passey-Melanom der Maus zu sein. Für eine erfolglose Tumortransplantation (geprüft nach 24 Stunden) benötigt es 5000 - 12 000 R als Einzelbestrahlung (83).

Diese in früheren Publikationen angenommene erhebliche Strahlenresistenz maligner Tiermelanome kann nach Trott (93) heute nicht mehr gestützt werden, denn Tiermelanome sollen sich nach ihm ähnlich empfindlich gegenüber Röntgenstrahlen wie HeLa-Zellen verhalten, bei günstigen höheren Einzeldosierungen und längeren zwischenzeitlichen Intervallen sogar noch labiler sein. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit stellt die partielle Synchronisation des Teilungszyklus durch wiederholte, zeitlich abgestimmte Gabe kleiner Röntgendosen dar. Bei Säugetierzellen besteht eine Sensibilität bereits bei 240 R in der G₂-Phase, eine geringere während der S-Phase (1).

Kombination von röntgentherapeutischem und chemotherapeutischem Vorgehen

Eine Strahlendosisreduzierung und damit Minderung der Nebenwirkungen strebt die Kombinationsbehandlung von Röntgen- und Chemotherapie, die sogenannte synzytostatische Therapie an. Ihr Ergebnis kann sich durch Summierung oder Potenzierung der Einzeleffekte zusammensetzen.

Auf molekularer Ebene könnte sich besonders für alle mit der DNS interkalierenden Substanzen eine Potenzierung durch veränderten Energietransfer oder erhöhte Bruchwahrscheinlichkeit der Nukleinsäureketten ergeben.

Untersucht wurden hinsichtlich einer synzytostatischen Behandlungsmöglichkeit 5-Fluorourazil, 5-Bromurazil, Actinomycin C, Actinomycin D, Chlorpromazin, Proresid^R, und Cyclophosphamid (29, 54, 65, 82).

5-Fluorourazil weist in Verbindung mit Röntgenstrahlen einen gesteigerten Hemmeffekt auf die DNS-, nicht aber RNS-Synthese auf (54). Für sich alleine bewirkt der Purinantagonist eine Verminderung der Methylierung bei der Thyminbildung auf der Desoxyribosidmonophosphatstufe. Der Ausfall von Thymidinnukleotiden verursacht Lücken in der DNS-Doppelspirale. Die Folge ist eine größere Labilität, und die Bruchwahrscheinlichkeit der DNS bei zusätzlicher Applikation von Röntgenstrahlen könnte gesteigert sein.

Mit 5-Bromurazil soll auf Grund einer direkten Wirkung innerhalb der DNS ebenfalls eine Strahlensensibilisierung möglich sein (54).

In Proliferationsgeweben der Maus bewirkte die synzytostatische Therapie mit Actinomycin C und Röntgenstrahlen eine Verstärkung und Verzögerung des zeitlichen Ablaufs der Strahlenreaktion (82).

Actinomycin D bleibt in einer strahlengeschädigten Zelle möglicherweise länger als sonst wirksam (65). Zusätzlich zeigt sich in der Wiederherstellungsphase nach Röntgeninsult der Vorgang des Verbindens einsträngig gewordener DNS-Bruchstücke zu neuer doppelsträngiger DNS als Actinomycin D-sensitiv (65).

Am Hamstermelanom MMel 1 ermöglichte die Absättigung freier Radikale des Melanins durch Chlorpromazin eine Sensibilisierung gegenüber Röntgenstrahlen (29). Die Aufhebung einer möglichen Schutzwirkung des Melanins äußerte sich in einer reduzierten Elektronenspinresonanz (29).

Durch Proresid^R wird die Zellteilung (z.B. von HeLa-Zellen) blockiert. Bestrahlt man nach einem bestimmten zeitlichen Intervall die so vorbehandelten und in ihrem Zellteilungsablauf synchronisierten Tumorzellen, werden vermehrt strahlensensible Mitosephasen erreicht (82).

4. Eigene Experimente

4.1. Material und Methoden

Versuchstiere waren 80 g schwere weibliche syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) aus der Versuchstierzucht Paul Bäumler, Wolfratshausen.

In der Regel wurden sie zu zweit in einem Käfig bei gleichbleibender Raumtemperatur von 20°C gehalten.

Sie erhielten Altromin^R - Haltungsdiät für Hamster von der Firma Altrogge-Lippe und Wasser ad libitum.

Der amelanotische Tumor AMel 3 von Fortner stammte aus einer fortgeschrittenen Transplantationsgeneration eines Tumorstamms, der an der Dermatologischen Klinik der Universität München gehalten wurde.

Nach Dekapitation der Tiere wurde der Tumor entfernt. In der Kälte (2-4°C) wurde das eigentliche Tumorgewebe von nekrotischen Bezirken abpräpariert, durch Waschen in physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und in einem modifizierten Homogenisator nach Potter-Elvehjem zerkleinert.

Nach Filterung der Zellsuspension durch Mullgaze erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle die Einstellung der Zellzahl auf $1-3 \times 10^6$ Zellen pro 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung.

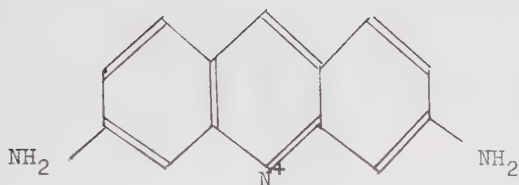
Zur Erhaltung des Tumorstamms wurden 0,5 ml dieser frisch gewonnenen Tumorzellsuspension in den Rücken der Tiere subkutan injiziert. Nach etwa vier Tagen zeigte sich ein Tumor bei allen Tieren in kaum unterschiedlicher Weise und führte später (nach ungefähr drei Wochen) zu ihrem Tod.

Die Messung der Tumorgröße erfolgte durch Feststellung der Wasserverdrängung in einem Meßzylinder.

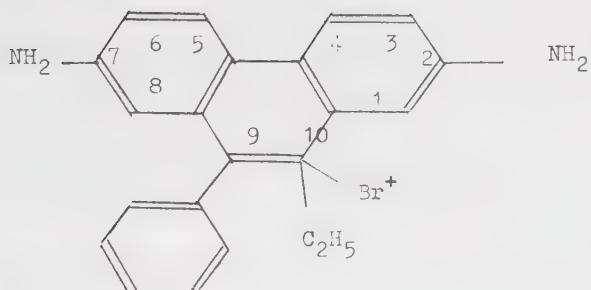
Proflavinsulfat (reinst) stammte von der Fluka AG, Buchs SG, Schweiz, Ethidiumbromid von der Firma Serva, Entwicklungslabor Heidelberg.

Für die orale Applikation wurden Proflavin (30 mg pro 100 ml) und Ethidiumbromid (15 mg pro 100 ml) in Aqua dest. gelöst. Für die parenterale Applikation betrug die Konzentration bei Proflavin 30 mg% in physiologischer Kochsalzlösung und bei Ethidiumbromid 250 mg% in physiologischer Kochsalzlösung.

Abb. I: Formeln für Proflavin und Ethidiumbromid



Proflavin
(MG = 210)



Ethidiumbromid
(MG = 364,3)
= 2,7 Diamino-
9-phenyl-10-äthyl
phenanthridinium-
bromid ($C_{12}H_{20}N_3Br$)

Diese Lösungen wurden mit Tris-Puffer auf pH 7,4 eingestellt und ständig lichtgeschützt und kalt aufbewahrt.

Bei längerem Stehen zeigten sie manchmal Ausfallreaktionen und mußten verworfen werden.

Röntgenbestrahlung erfolgte mit dem Dermopan^R der Firma Siemens, meist bei Stufe IV (50 kV, 25 mA), 1 mm Al-Zusatzfilter, 15 cm Fokus-Haut-Abstand (FHA) und einer Gewebs-halbwertstiefe (GHWT) von 10 mm.

4.2. Vorversuch zur Immunisierung mit homologen Zellen

Mehrfachinjektion von homologen, Antigen-kompetenten Zellen führt zu einer aktiven Immunisierung der Tiere gegen diesen Tumor (84). Sowohl zytotoxische Lymphozyten wie auch humorale Antikörper (Immunglobuline) werden aktiviert. Diese Reaktion wird auch als Booster-Reaktion bezeichnet. Je nach Dosis und zeitlichem Abstand der Wiederholungsimpfung variiert die Entwicklung einer spezifischen Immunität, die sich in verlängerter Überlebenszeit der Tiere und Tumorgroße niederschlägt.

Im Versuch zur Nachprüfung einer solchen Reaktion bei Melanom-tragenden Hamstern nach wiederholter Transplantation homologer Tumorzellen wurden zehn Tiere mit 0,5 ml Zellsuspension, also $1-3 \times 10^6$ Zellen des amelanotischen Hamstermelanoms AMel 3 von Fortner, subkutan injiziert. Die gleiche Dosis erhielten sie täglich bis zum zehnten Tag. Kontrolltiere erhielten nur einmal $1-3 \times 10^6$ Melanomzellen.

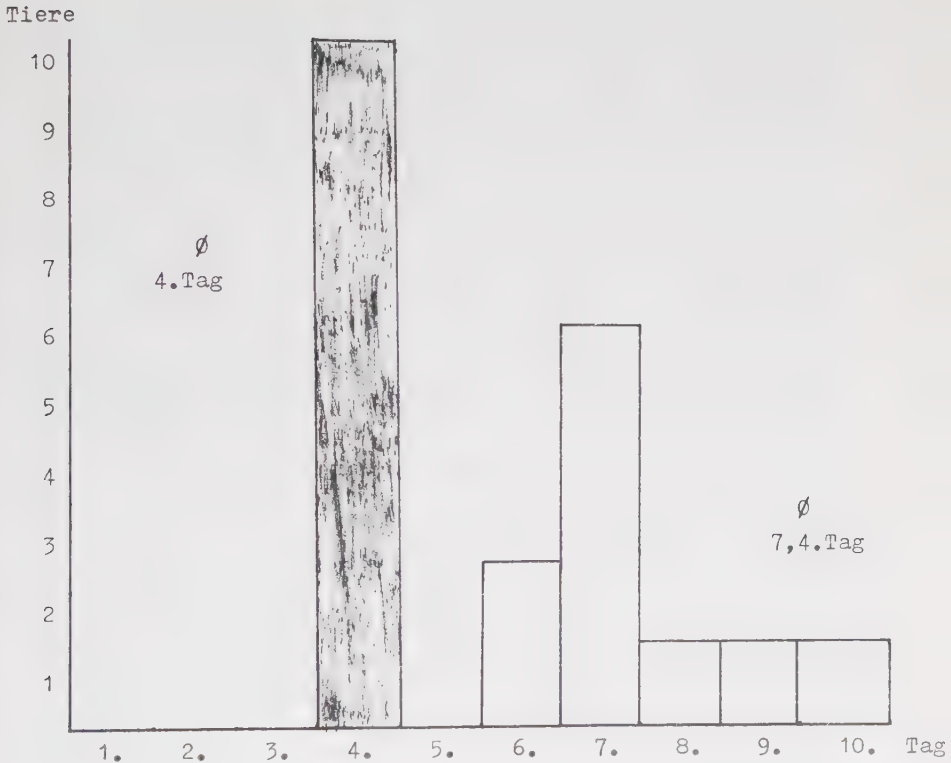
Die Zellsuspension wurde portioniert und je nach Bedarf frisch überimpft oder bei -28°C eingefroren und später wieder aufgetaut. Aus einem Kontrollversuch dazu ging hervor, daß Hamster, denen eingefrorenes Tumormaterial injiziert wurde, erst nach 14 Tagen palpable Tumoren aufwiesen, während solche, denen frisch gewonnene Tumorzellen injiziert wurden, bereits nach 3-5 Tagen Knotenbildungen zeigten. In den Versuchstieren entwickelten

Abb. II: Zeitpunkt des Angehens der Hamstermelanome nach Immunisierung mit homologen Zellen

10 Versuchstiere (□) und 10 unbehandelte Kontrolltiere (▨)

Ordinate: Zahl der erkrankten Tiere

Abszisse: Zeitpunkt der nachweisbaren Melanomentstehung



sich die Melanome verzögert, im Durchschnitt waren sie nach 7,4 Tagen tastbar vorhanden. Das entspricht einer Verzögerung des Angehens um 3,4 Tage oder 85 %.

Auch das weitere Wachstum schien verlangsamt zu sein, Nekrosen und Perforationen der Tumoren durch die Haut traten ebenso verzögert auf (Abb. II).

4.3. Orale Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid

Eine Behandlung experimenteller Melanome mit Farbstoffen wie Proflavin und Ethidiumbromid könnte auf Grund der spezifischen Interaktionen dieser Substanzen mit Nukleinsäuren, möglicherweise auch viralen, einen aussichtsreichen therapeutischen Weg darstellen.

Erste Versuche sollten klären, ob Proflavin und Ethidiumbromid grundsätzlich bei oraler Applikation verträglich sind.

Die Lebensdauer galt als Maßstab für den Behandlungserfolg.

Den 6 bzw. 4 Tieren wurde gleich nach der Zelltransplantation die entsprechende Lösung in den üblichen Trinkflaschen gegeben.

Zum Vergleich wurden 8 Tiere mit unbeeinflusster Tumorentwicklung gehalten.

Die täglich aufgenommene Substanzmenge betrug für Proflavin 24 mg/kg Körpergewicht (KG), für Ethidiumbromid 20 mg/kg KG. Die verabreichte Gesamtdosis belief sich bei Proflavin auf 384 mg/kg KG und bei Ethidiumbromid auf 330 mg/kg KG. Bei dieser Therapie betrug die durchschnittliche Lebensdauer bei Proflavin-behandelten Hamstern 16 Tage, bei Ethidiums-bromid-behandelten 16,5 Tage, was einer Verminderung der Überlebenszeit gegenüber den Kontrolltieren um 20 % beziehungsweise 17,5 % gleichkommt.

Die Kontrolltiere wurden 20 Tage alt.

Während die Hamster anfangs reichlich Flüssigkeit (5-10 ml/Tag) aufnahmen, besonders die Ethidiumbromidlösung, tranken sie bei

Tabelle I: Einfluß der oralen Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid auf die Lebensdauer der Versuchstiere

8 unbehandelte Kontrolltiere, 6 Proflavin- und
4 Ethidiumbromid-behandelte Tiere

	Überlebenszeit in Tagen	in % der Kontrollen
Kontrollen (unbehandelt)	20	100%
Proflavin oral 2,4 mg/die	16	80%
Ethidiumbromid oral 2 mg/die	16,5	82,5%

fortgeschrittenerem Tumorstadium nur noch sehr wenig. Bemerkenswert war weiterhin ein erheblich schlechteres Allgemeinbefinden der behandelten Tiere bei gleichzeitiger Verzögerung der Tumorentwicklung (Tab. I).

4.4. Parenterale Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid

Wegen der nicht exakt definierbaren oralen Aufnahme und der offensichtlich doch zu toxisch wirkenden Zugabe von einem der beiden Chemotherapeutika zum Trinkwasser wurden diese in den nächsten Serien subkutan und in sicherer Entfernung zum transplantierten Tumor verabreicht.

Die Dosis war für Proflavin 25 mg/kg KG und Tag, für Ethidiumbromid zuerst dieselbe, später aber die halbe Menge, nämlich 12,5 mg/kg KG und Tag.

Die Applikation erfolgte vom Tag der Tumorzellübertragung an in täglicher Folge.

Im ersten Versuch stellte sich für zwei Ethidiumbromid-behandelte Tiere eine Lebensdauer von nur 14,7 Tagen bei einer Tumorgroße von nur $0,9 \text{ cm}^3$ heraus. Daraufhin wurde die Dosis auf die Hälfte reduziert.

Die nächsten vier Hamster erreichten dann eine Lebensdauer von 20,3 Tagen und eine Tumorgroße von $8,3 \text{ cm}^3$. Das entspricht einer verlängerten Lebenszeit von 72,6 %, aber auch einer Zunahme des Geschwulstvolumens um 90 % gegenüber der mit 2,5 mg/die behandelten Versuchsreihe (Tab.II).

Tabelle II: Lebensdauer und Tumorgröße nach s.c. Injektion
von täglich 2,5 mg bzw. 1,25 mg Ethidiumbromid
(für 2 bzw. 4 Hamster) gegenüber 4 unbehandelten
Kontrolltieren

	Überlebenszeit in Tagen	Tumorzvolumen in cm ³ .
Ethidiumbromid s.c. 2,5 mg/die	14,7	0,9
Ethidiumbromid s.c. 1,25 mg/die	20,3	8,3
Kontrollen (unbehandelt)	21,5	8,7

Tabelle III: Hamstermelanom AMel 3: Überlebenszeit (Tage) und Tumorgroße (cm³) unter dem Einfluß von Proflavin bzw. Ethidiumbromid alleine, in Kombination mit Röntgenstrahlen (R) und alleiniger Röntgenbehandlung.

A. 11 unbehandelte Kontrolltiere und 11 ausschließlich mit Röntgenstrahlen behandelte Tiere (1000 R/die).

Tiere	Kontrollen (unbehandelt)		Röntgentherapie		
	Tage	cm ³	Tage	cm ³	R
1.	23	9	35	1	18 000
2.	24	12	20	4	9 000
3.	21	10	23	0,5	12 000
4.	22	8,5	25	3	14 000
5.	20	5	37	6	14 000
6.	16	9	14	0,5	5 000
7.	19	10	18	9	9 000
8.	20	7	19	2,5	10 000
9.	21	10	21	1	10 000
10.	24	10	22	0,5	11 000
11.	27	5	27	3,5	11 000
Durchschnitt	21,5	8,7	23,7	2,9	11 173
in Prozent d. Kontrollen	100%	100%	110,2%	33%	
in Prozent d. Röntgen-behan- delten Serie			100%	100%	

Tabelle III: Hamstermelanom AMel 3: Überlebenszeit (Tage) und Tumorgroße (cm^3) unter dem Einfluß von Proflavin, bzw. Ethidiumbromid alleine, in Kombination mit Röntgenstrahlen (R) und alleiniger Röntgenbehandlung.

B. 11 Proflavin- und 16 Ethidiumbromid-behandelte Tiere (s.c. 2,5 bzw. 1,25 mg/die)

Tiere	Proflavin-Therapie		Ethidiumbromid-Therapie	
	Tage	cm^3	Tage	cm^3
1.	20	7,5	15	0,6
2.	22	6	16	1,1
3.	27	13	24	10
4.	20	9	18	11
5.	21	7	19	8
6.	27	5	20	4
7.	20	8	13	4
8.	22	7	16	3
9.	24	8	16	3
10.	19	13	17	5
11.	9	2	19	8
12.			21	2
13.			22	2
14.			22	4
15.			23	1,2
16.			24	1,5
Durchschnitt	21	7,8	19	4,3
in Prozent d.				
Kontrollen	97,5%	89,5%	88,2%	49,2%

Tabelle III: Hamstermelanom AMel 3: Überlebenszeit (Tage) und Tumorgroße (cm³) unter dem Einfluß von Proflavin, bzw. Ethidiumbromid alleine, in Kombination mit Röntgenstrahlen (R) und alleiniger Röntgenbehandlung.

C. 11 Proflavin- und mit Röntgenstrahlen behandelte und 11 Ethidiumbromid- und mit Röntgenstrahlen behandelte Tiere (s.c. 2,5 bzw. 1,25 mg/die und 1000 R/die)

Tiere	Proflavin und Röntgenbehandlung			Ethidiumbromid und Röntgenbehandlung		
	Tage	cm ³	R	Tage	cm ³	R
1.	28	5	10 000	33	7	12 000
2.	29	2	11 000	33	0,25	19 000
3.	34	0,5	14 000	19	12	9 000
4.	17	6	8 000	24	4	10 000
5.	21	4	11 000	28	0,2	14 000
6.	22	2	12 000	14	1	5 000
7.	27	2,5	14 000	15	3	6 000
8.	14	5	5 000	18	2	8 000
9.	21	6	10 000	21	0,5	10 000
10.	21	3	10 000	22	1	11 000
11.	21	2	10 000	9	0,5	1 000
Durchschnitt	23,2	3,5	10 455	21,9	2,9	9 546
in Prozent d. Kontrollen	107,6%	39,9%		101,7%	33%	
in Prozent d. Röntgen-behandelten Serie	97,7%	97,9%		92,3%	100%	

In einer zweiten Versuchsreihe mit parenteraler Applikation standen zum Vergleich von Lebensdauer und Tumorgröße für Ethidiumbromid 16 Hamster, für Proflavin 11 und als Kontrolltiere ebenfalls 11 Hamster zur Verfügung.

Die Lebensdauer der Kontrolltiere betrug im arithmetischen Mittel 21,5 Tage, der Proflavin-behandelten 21 Tage, der Ethidiumbromid-behandelten 19 Tage.

Die Tumorgröße der Kontrolltiere war im Durchschnitt $8,7 \text{ cm}^3$, nach Proflavingabe $7,8 \text{ cm}^3$, nach Ethidiumbromidgabe $4,3 \text{ cm}^3$.

Beide Verbindungen bewirkten also eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums. Die Verringerung der Tumorgröße belief sich nach Proflavininjektion auf 10,5% und nach Ethidiumbromidinjektion auf 50,8% gegenüber den Kontrollen (Tab. III).

Proflavingaben führten allerdings in der angegebenen Dosierung zu einer geringfügigen Lebensverkürzung von 2,5%; Ethidiumbromidgaben reduzierten in der angegebenen Dosierung die Lebenserwartung der Tiere immerhin schon um 11,8%.

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Vorversuche zur Immunisierung mit homologen Zellen

Das beim Immunisierungsversuch mit homologen Zellen festgestellte, um 3,4 Tage oder 85% verzögerte Angehen der Tumoren ist am ehesten vergleichbar mit ähnlichen Versuchsergebnissen von Salomon et al. (84) über eine derartige aktive Immunisierung gegen MMel 1-Hamstermelanome. Die 2- bis 3-malige Impfung (während 5-19 Tagen) circa 4 Monate alter Hamster brachte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse.

Demgegenüber ließen sich DNS-Virus-Tumoren (von Adenovirus Typ 12 und SV 40-Virus) durch mehrmalige Zufuhr homologer Antigene in Form isolierter, intakter Viren während der Latenzperiode maßgeblich beeinflussen (34).

Isolierte Tumurviren scheinen demnach für einen Immunisierungsversuch wesentlich geeigneter zu sein als homologe Tumorzellen. Die Nebenwirkungen bei einer Übertragung homologer Tumorzellen, z.B. Sensibilisierung, entfallen.

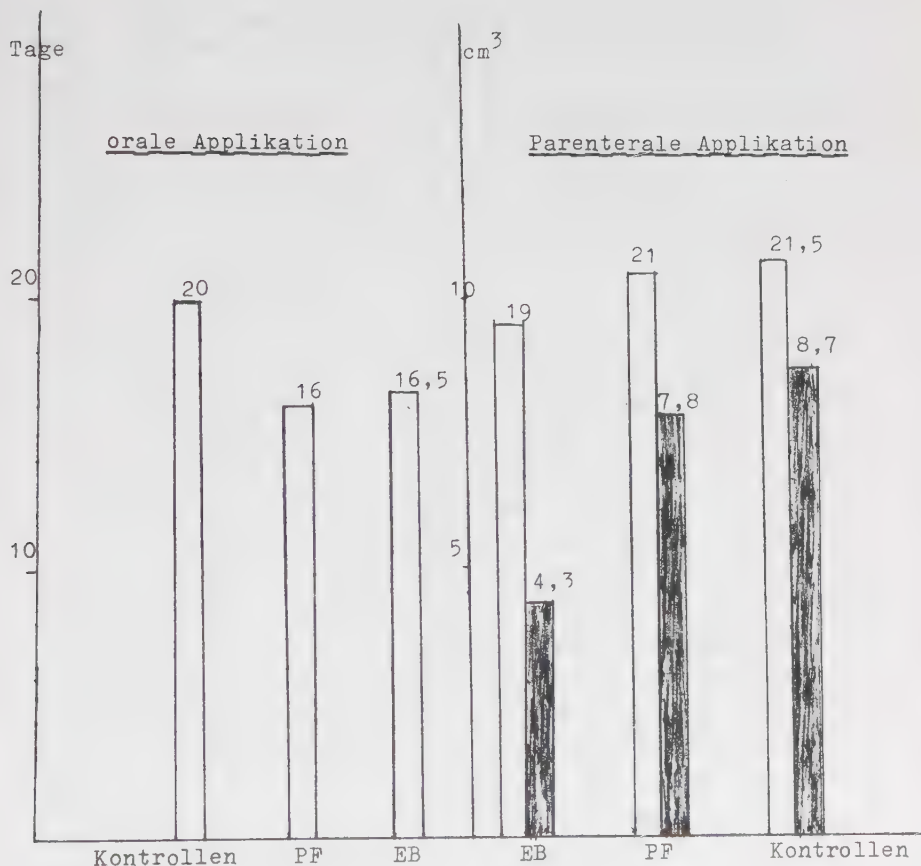
Ein anderes Problem bei Immunisierungsversuchen mit homologen Tumorzellen ist deren uneingeschränkte antigene Kompetenz. Vitale Tumorzellen sind potentiell teilungsfähige Zellen. Der Antikörperstimulierung steht die Gewißheit einer multiplen Tumormanifestation gegenüber. Es ist deshalb geplant, in weiteren Versuchsreihen durch Zytostatikazusätze oder Röntgenvorbestrahlung teilungsunfähig gemachte Zellen zu verwenden.

Die im Vorversuch zur Immunisierung mit homologen Tumorzellen verabreichten eingefrorenen Tumorzellen brachten insofern allerdings schon einen gewissen gewünschten Vitalitätsverlust der Tumorzellen mit sich, denn durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen werden die Zellen zerstört und Nukleasen und andere abbauende Enzyme freigesetzt. Die Wachstumsrate der Tumoren verringerte sich um das durchschnittlich 3 1/2fache, wenn eingefrorene anstelle frischer Tumorzellen verwendet wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Salomon et al. (84).

5.2. Behandlung mit Proflavin und Ethidiumbromid

Proflavin und Ethidiumbromid zeigten eine hohe zytostatische Wirksamkeit (6,22). Birkmayer et al. (22) fanden, daß sowohl Proflavin als auch Ethidiumbromid (4 mg in einer Tumorzellsuspension bzw. 2,5 mg in einer subzellulären Fraktion) die zellfreie Übertragung des AMel 3 verhindern. Nach Verabreichen dieser Substanzen während der ersten 12 Stunden nach Tumorzellüberimpfung kann die Tumorentstehung gehemmt werden. Das Tumorstadium wird durch laufende subkutane Injektion verlangsamt und die Gesamtlebensdauer von 18 - 20 Tagen auf mindestens drei Monate verlängert.

Abb. III: Vergleich der Wirkung von Proflavin (PF) und Ethidiumbromid (EB) nach oraler bzw. parenteraler (s.c.) Applikation (Versuchsbedingungen wie in Tab. I und III).



Ordinate: Überlebenszeit in Tagen (□) und Tumervolumen (■) in cm³ (nicht gemessen bei oraler Applikation von Proflavin bzw. Ethidiumbromid)

Abszisse: Verschiedene Behandlungsmethoden

Bei den hier beschriebenen Versuchen erreichten wir eine Verringerung der Tumorgroße um 10,5% mit Proflavin und um 50,8% mit Ethidiumbromid. Allerdings verkürzte sich gleichzeitig die Lebensdauer um 2,5% bei Proflavin bzw. 11,8% bei Ethidiumbromid nach parenteraler Applikation und um 17,5% bei Proflavin bzw. 20% bei Ethidiumbromid nach oraler Gabe der Substanzen.

Dieses Ergebnis läßt sich wohl nur auf die erheblich toxischen Nebenwirkungen zurückführen, die besonders bei enteraler Gabe aufzutreten scheinen (Abb. III). Für Ethidiumbromid sind sie auch ersichtlich aus dem Versuch mit unterschiedlichen Dosen (Tab. II).

Dort wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren eine 10-mal geringere Tumorgroße mit einer um 27,4% kürzeren Lebenserwartung erkauft.

Balda et al. (5) konnten zeigen, daß Proflavin zu einer starken Beeinträchtigung des DNS-, RNS- und Protein-stoffwechsels von Hamstermelanomzellen führt. Die im Versuch benutzten Dosen von subkutan 31,25 mg/kg KG Proflavin und 15,63 mg/kg KG Ethidiumbromid bzw. oral 30 mg/kg KG Proflavin und 25 mg/kg KG Ethidiumbromid haben zwar einen guten tumorinhibierenden Effekt, sind jedoch zu stark allgemein toxisch. Als Dauertherapie muß die Dosierung offensichtlich niedriger liegen. Möglicherweise können Veränderungen im Farbstoffmolekül zu einem besseren therapeutischen Index führen.

Als günstigste Applikationsart erwies sich die subkutane Verabreichung. Hier betrug die Lebensdauer für Proflavin-behandelte Tiere 19 Tage, bei Ethidiumbromid 21 Tage, während sich nach oraler Gabe die Überlebenszeit unter Proflavin nur auf 16 Tage, bei Ethidiumbromid auf 16,5 Tage belief. Das bedeutet im Trinkversuch eine Reduktion der Lebensdauer um ca. 20% gegenüber der Injektionsbehandlung.

Möglicherweise ist die offensichtlich schädlichere enterale Applikation auf eine lokale Beeinträchtigung des sich rasch mausernden Darmepithels zurückzuführen, da es ja bei

oralen Aufnahme der Chemotherapeutika im Gegensatz zur subkutanen Injektion direkt lokal betroffen ist. Diese Annahme wird untermauert durch das Austreten von Gewebsresten und Blut aus dem Enddarm einiger Hamster kurz vor deren Tod. Während der Injektionsbehandlung mit einem der beiden Zytostatika zeigte sich kein solcher Befund. Lediglich die Einstichnarben blieben lange tast- und sichtbar.

Wie bereits erwähnt, besitzen Proflavin und Ethidiumbromid die Fähigkeit, mit zirkulären und doppelsträngigen Nukleinsäuren zu interkalieren (81). Innerhalb der Zelle sind deshalb die Mitochondrien besonders betroffen. Der Sandwich-ähnliche Komplex von Farbstoffmolekülen und Nukleinsäuren ist schuld an der Behinderung deren Reduplikation. Ethidiumbromid und Proflavin hemmen dabei den Beginn der Nukleinsäuresynthese, Ethidiumbromid bei hoher Konzentration auch die Kettenverlängerung (80).

In einer Normalzelle wird durch beide zytostatisch wirkenden Verbindungen die DNS-abhängige DNS- und RNS-Synthese, nicht aber die Proteinbildung gehemmt (12). Lediglich mitochondrienspezifische Proteine werden beeinflusst. Anders ist es in virustransformierten Zellen. Tumorspezifische Proteine scheinen empfindlich gegenüber Proflavin und Ethidiumbromid zu sein, was Disk-elektrophoretisch untersucht wurde (17). Entsprechend dem vermehrten Einbau von Aminosäuren in tumormitochondriale Proteine zeigten sich dort starke, durch Proflavin hemmbare Proteinbanden. Balda und Birkmayer (11,23) diskutierten folgende Angriffspunkte: Nach Hemmung der reversen Transkriptase (Virus-RNS gesteuerte DNS-Polymerase) kann selektiv die Übertragung viraler auf zelleigene Geninformation gestört werden. Durch eine feste Bindung an RNS wird möglicherweise deren Ablösung von den Ribosomen erschwert (sog. eingefrorene Ribosomen).

Demnach scheint die Beeinträchtigung des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels neben einem melanomspezifischen vor allem einen allgemein toxischen Effekt darzustellen. Bei der guten Verteilung von Proflavin und Ethidiumbromid im Organismus werden fast alle Organsysteme gleichermaßen

geschädigt, wenngleich parenchymatöse Organe wie Leber und Nieren besonders betroffen sind.

5.3. Vergleich von Röntgen- und synzytostatischer Therapie

Vergleicht man die Ergebnisse einer Kombinationsbehandlung mit Proflavin bzw. Ethidiumbromid und fraktionierter Röntgenbestrahlung von 1000 R und einer Gesamtdosis von etwa 10 000 R (97) und die einer Mono-Chemotherapie mit einer der Substanzen mit den Werten von Kontrolltieren, so ergibt sich für die erstgenannte Behandlungsart sowohl eine Verlängerung der Überlebenszeit als auch eine bemerkenswerte Einschränkung des Tumorwachstums.

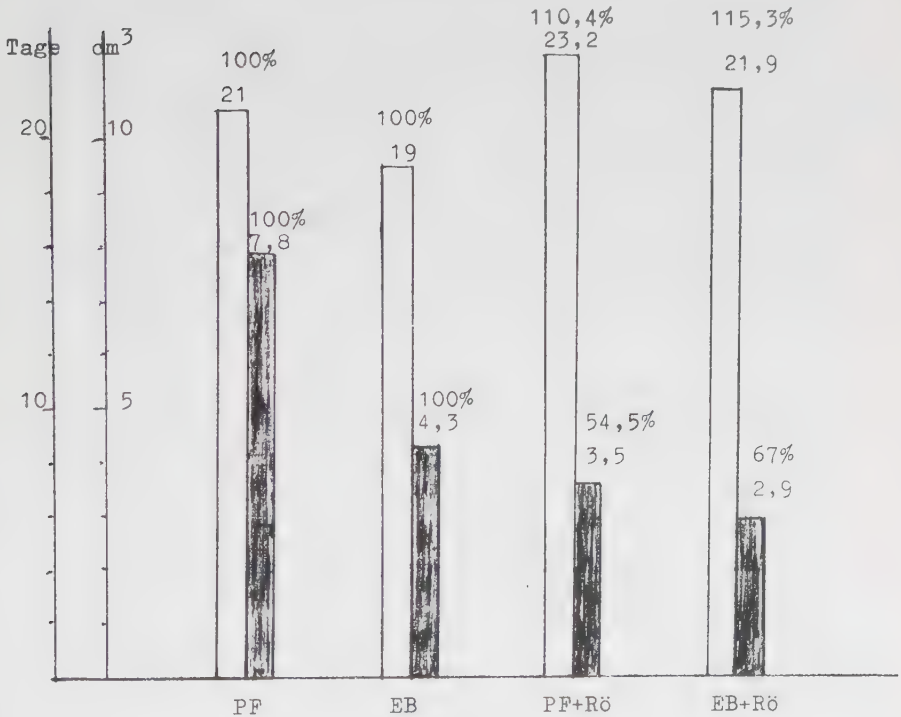
Die Zahlenwerte betragen hinsichtlich der Zunahme der Lebensdauer gegenüber den Kontrolltieren für Proflavin und Röntgentherapie 7,6% und für Ethidiumbromid und Röntgentherapie 1,7%.

Die Tumorgroße verringerte sich bei Proflavin und Röntgentherapie um 60,1%, bei Ethidiumbromid und Röntgentherapie um 67%.

Eine weitere Serie von 11 Hamstern wurde nur mit Röntgenstrahlen (1 000 R, 5 mal pro Woche) behandelt und zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine um 10,2% längere Lebenszeit und eine um 67% geringere Tumorgroße (97) (Tab. III).

Im Vergleich zu dieser nur strahlenbehandelten Serie waren die Werte für die Kombinationsbehandlungsreihe etwas ungünstiger. Für Proflavin und Röntgentherapie ergab sich eine Verkürzung der Überlebenszeit gegenüber alleiniger Röntgentherapie um 2,3%, für Ethidiumbromid und Röntgentherapie um 7,7%. Das Tumolvolumen war bei ersterer Gruppe um 21% größer als bei alleiniger Röntgentherapie, bei letzterer zeigten sich keine Veränderungen.

Abb. IV: Vergleich der Wirkung einer Chemotherapie mit Proflavin (PF) bzw. Ethidiumbromid (EB) und einer Kombination mit Röntgenstrahlen (PF + Rö, EB + Rö) auf Überlebenszeit (□) und Tumorstadium (■) (Versuchsbedingungen wie in Tab. I und III)



Ordinate: Überlebenszeit in Tagen und Tumorstadium in cm³

Abszisse: Verschiedene Behandlungsmethoden

Stellt man die alleinige Chemotherapie mit Proflavin und Etnidiumbromid der Kombination von Röntgenbestrahlung und Proflavin bzw. Ethidiumbromid gegenüber, so ergibt sich für die Kombination mit Proflavin eine um 10,4% höhere Lebensdauer als bei Proflavin-Monotherapie, für Ethidiumbromid eine um 15,3% größere Überlebensrate als bei alleiniger (parenteraler) Gabe von Ethidiumbromid. Besonders deutlich wird dieser günstigere Effekt jedoch hinsichtlich der Tumorgröße. So war diese bei der Kombination mit Proflavin um 45%, bei der mit Ethidiumbromid um 33% geringer als bei entsprechender Mono-Chemotherapie mit Proflavin bzw. Ethidiumbromid (Abb. IV).

Auf Grund der aufgeführten Ergebnisse scheint für das bessere Resultat der Kombinationstherapie gegenüber alleiniger Chemotherapie im wesentlichen die Bestrahlung verantwortlich zu sein, da mit ihr alleine die besten Gesamtergebnisse erzielt wurden.

Die vielfach angenommene Strahlenresistenz konnte von uns für das Hamstermelanom nicht bestätigt werden. Allerdings war die Strahlendosis mit 10 500 R (fraktioniert zu 10 mal täglich 1000 R) verhältnismäßig hoch. Sie wurde relativ gut vertragen.

Lokale Schäden durch die Röntgentherapie zeigten sich im Versuch als schwer heilende trockene Hautnekrosen über dem Primärtumor. Inwieweit ein schlechteres Allgemeinbefinden auf die Bestrahlung oder den malignen Gesamtverlauf einschließlich Metastasierung zurückzuführen war, ließ sich nicht sicher entscheiden. Daß die Proflavin- und Ethidiumbromid-behandelten und bestrahlten Tiere gegenüber den nur bestrahlten eine kürzere Lebenserwartung hatten, muß wohl auf die hohe Toxizität und die relativ zu hohe Dosierung dieser Pharmaka zurückgeführt werden. Aus Tabelle II wird ersichtlich, daß der ungünstige (toxische) Effekt bezüglich der Überlebenszeit beim Ethidiumbromid allerdings mit einer stärkeren Wirksamkeit hinsichtlich der Verringerung der Tumorgröße korreliert.

Röntgenbestrahlung führt zu einer Destruktion auch einsträngiger DNS- und RNS-Moleküle. Damit wäre eine besondere Schädigung viraler, auch bereits transkribierter, einsträngiger Nukleinsäurestränge denkbar. Dazu kommt die chemische Wirkung (Sekundärwirkung) der Röntgenstrahlen durch Bildung von Radikalen.

Proflavin und Ethidiumbromid zeigen eine besondere Affinität zu kurzen, zirkulären doppelsträngigen Nukleinsäuren. Indem sie sich Sandwich-artig in diese einlagern, behindern sie die Funktion der DNS-abhängigen DNS- und RNS-Polymerasen. Folglich ist bei der Kombinationsbehandlung eine erhöhte therapeutische Wirksamkeit gegenüber der Einzeltherapie mit Proflavin oder Ethidiumbromid zu erwarten. Möglichkeiten einer optimalen Gestaltung dieser Maßnahmen müssen durch Veränderung von Dosis, Zeitfolge und Abwandlung der Farbstoffmoleküle noch erarbeitet werden.

6. Zusammenfassung

Das menschliche maligne Melanom zeichnet sich durch rapide Verlaufsform und frühe Metastasierungstendenz aus. Dadurch sind sowohl die Früherkennung (einschließlich Differentialdiagnose) als auch die therapeutische Beeinflussung äußerst schwierig.

Bewährte therapeutische Maßnahmen wie chirurgische Intervention oder Bestrahlung, erreichten eine Überlebensrate von maximal 30% für alle Tumorstadien. Eine Kombination von unspezifischer Immunotherapie mit BCG und Chemotherapie mit DTIC scheint immerhin die Lebenserwartung beträchtlich erhöhen zu können.

Besonders hinsichtlich einer chemotherapeutischen Beeinflussung - auch in Kombination mit anderen therapeutischen Maßnahmen - sucht man neue Ansatzpunkte für eine effektivere

Behandlung. Deshalb wurden Versuche an einem geeigneten Tiermodell unternommen.

Das Hamstermelanom AMel 3 ist nach morphologischen und biologischen Eigenschaften dem menschlichen malignen Melanom sehr ähnlich.

Die Vermutung, mit täglicher Injektion homologer Tumorzellen eine aktive Immunisierung gegen das AMel 3 bewirken zu können, bestätigte sich im Versuch. Das erste Auftreten von Tumoren war bei behandelten Versuchstieren erheblich verzögert. In weiteren Untersuchungen sollten jedoch die injizierten Tumorzellen teilungsunfähig gemacht werden.

Die Farbstoffe Proflavin und Ethidiumbromid erweisen sich als hochwirksame Pharmaka. Ihre Fähigkeit, mit DNS und RNS Komplexe zu bilden, eröffnet neue Angriffsmöglichkeiten, möglicherweise insbesondere in virustransformierten Zellen.

Die Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid scheint günstiger parenteral als oral zu sein, wie der Vergleich von Injektion und oraler Gabe der Farbstoffe zeigte. Die Überlebenszeit der Tiere nach Tumortransplantation war in ersterer Versuchsreihe um etwa 20% höher als in der letzteren. Bei parenteraler Applikation von Proflavin und Ethidiumbromid konnte das Tumolvolumen um 10,5% bzw. 50,8% gegenüber den Kontrolltieren reduziert werden. Beide Pharmaka zeichnen sich jedoch durch einen gewissen lebensverkürzenden Effekt aus, der auf die allgemein toxische Wirkung - vor allem gegenüber parenchymatösen Organen wie Leber und Nieren - zurückgeführt wird. Deshalb müssten diese Farbstoffe in ihrer Molekülstruktur abgewandelt werden, um auch in der Humanmedizin genutzt werden zu können.

Besonders günstige Resultate erzielten Proflavin und Ethidiumbromid in Kombination mit Röntgenstrahlen. Die Lebens-

erwartung stieg bei der Kombination mit Proflavin um 10,4% gegenüber einer Mono-Chemotherapie und bei der Kombination mit Ethidiumbromid um 15,3%. Das Tumorumfang reduzierte sich bei der Kombination mit Proflavin um 45%, bei der mit Ethidiumbromid um 33% gegenüber der alleinigen Injektionsbehandlung.

Die Hauptursache für die erhöhte therapeutische Wirksamkeit dieser synzytostatischen Behandlung mit Proflavin und Ethidiumbromid schien besonders in der Bestrahlung zu liegen, da mit ihr alleine die besten Gesamtwerte erzielt wurden. Aus den Versuchsergebnissen und auch aus den molekularbiologischen Angriffspunkten von Proflavin, Ethidiumbromid und Röntgenstrahlen in Melanomzellen ergeben sich jedoch Hinweise auf eine vorteilhafte radio-mimetische Wirkung dieser DNS-interkalierenden Farbstoffe.

7. Literaturverzeichnis

1. Ammon J., K.zum Winkel, H.J.Hermann, B.Janßen, L.Schmitt, W. Günther: Grundlagen, Technik und klinische Durchführung der synchronisierten Strahlentherapie. Strahlentherapie 144, 625-634 (1972)
2. Balda B.-R.: RNS-Viren als Krebsursache. Dtsch.med. Wschr. 98, 2452-2454 (1973)
3. Balda B.-R.: Zur Molekularbiologie des Hamstermelanoms AMel 3, einem möglichen Modell für das menschliche maligne Melanom. Habilitationsschrift, Universität München 1971
4. Balda B.-R.: RNS-Viren aus onkogenetischer Sicht. Internationales Symposium über Herpes simplex-Behandlung mit Lupidon und Fragen einer virusinduzierten Onkogenität. XIII.Reinbecker Kolloquium, Sonderdruck. Hermal-Chemie, K.H. Reinbeck, Wien 1975
5. Balda B.-R., G.D.Birkmayer: Zur Hemmwirkung von Proflavin auf den Einbau von DNS-, RNS- und Proteinvorstufen im Hamstermelanom. Arch.Derm.Forsch. 243, 107-113 (1972)
6. Balda B.-R., G.D.Birkmayer: Der Einfluß von Proflavin auf den DNS-Stoffwechsel des Hamstermelanoms. Arch.klin. exp.Derm. 239, 176-184 (1970)
7. Balda B.-R., G.D. Birkmayer, H.H.Wolff, O.Braun-Falco: Virus-Like Particles in the Hamster Melanoma AMel 3 of Fortner. Naturwissenschaften 57, 548 (1970)
8. Balda B.-R., G.D.Birkmayer: Nukleinsäure- und Proteinsynthese des Hamstermelanoms unter dem Einfluß von Pharmaka. I. In-vivo-Studien der DNS-Synthese in Hamstermelanomen. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 266 291-291 (1970)

9. Balda B.-R., G.D.Birkmayer: Zum Stoffwechsel maligner Melanome. Biochemische Untersuchungen. Arch.Derm.Forsch. 244, 278-279 (1972)
10. Balda B.-R., G.D.Birkmayer, O.Braun-Falco: Particle-Associated DNA-Polymerase and 70 S-RNA in the Hamster Melanoma AMel 3. Arch.Derm.Res. 248, 229-236 (1973)
11. Balda B.-R., G.D.Birkmayer: Drug Effects in Melanoma: Tumor Specific Interactions of Proflavine and Ethidium-bromide. Yale J.Biol. 46, 464 (1973)
12. Balda B.-R., R. Hehlmann, J.-R.Cho. S.Spiegelmann: Oncorna-Virus-Like Particles in Human Skin Cancers. Proc.Nat. Acad.Sci. (USA) 72, 3697-3700 (1975)
13. Bauer K.H.: Das Krebsproblem. Einführung in die allgemeine Geschwulstlehre für Studierende, Ärzte und Naturwissenschaftler. 2.Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963, Teil I, S. 1-201
14. Becker J.: Megavolttherapie - Indikationen und Ergebnisse. Strahlentherapie 139, 261-270 (1970)
15. Bickhardt R.: Zum derzeitigen Stand der Immuntherapie beim malignen Melanom. Acta dermat.-venerol. 1, 55-63 (1975)
16. Birkmayer G.D.: Zell- und molekularbiologische Indizien für die Virusätiologie des Melanoms. Habilitationsschrift, Universität München 1973
17. Birkmayer G.D., B.-R.Balda: Differences in the In Vitro Amino Acid Labelling Pattern of Mitochondria from Melanoma and Liver. FEBS Letters 15, 156-160 (1971)
18. Birkmayer G.D., B.-R. Balda, F.Miller, O.Braun-Falco: Virus-Like Particles in Metastases of Human Malignant Melanoma. Naturwissenschaften 59, 369-370 (1972)

19. Birkmayer G.D., F. Miller, B.-R.Balda: Inhibition of High Molecular Weight RNA-Synthesis in a Hamster Melanoma by Ethidiumbromide in Vivo. Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 353, 1749-1754 (1972)
20. Birkmayer G.D., B.-R. Balda: Proflavine Inhibition of Protein-Synthesis in Malignant Hamster Melanoma. FEBS Letters 11, 221-223 (1970)
21. Birkmayer G.D., B.-R.Balda: Evidence for Proflavine Sensitive Proteins in Malignant Hamster Melanoma. Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 352, 780-790 (1971)
22. Birkmayer G.D., B.-R.Balda, F. Miller: The Inhibitory Effect of Proflavine and Ethidiumbromide on the Cell-Free Transmission and the Growth of the Hamster Melanoma AMel 3. Europ.J.Cancer 9, 859-864 (1973)
23. Birkmayer G.D., B.-R.Balda, F. Miller: Oncorna Viral Information in Human Melanoma. Europ.J.Cancer 10, 419-424 (1974)
24. Braun-Falco O.: Maligne Melanome aus dermatologischer Sicht. Chirurg 45, 345-356 (1974)
25. Bundesamt für Statistik: Mehr Todesfälle durch Kreislaufkrankheiten. Dtsch.med.Wschr. 46, 1815-1816 (1971)
26. Cascinelli N., S.Pilotti: Metastasi di melanoma a sede primaria occulta. Tumori 55, 403-408 (1969)
27. Clark W.H.: A. Classification of Malignant Melanoma in Man Correlated with Histogenesis and Biologic Behaviour, Advances in Biology of Skin. Vol.8, The Pigmentary System, p.621. Ed. by Montagna W., Hu F., London: Pergamon Press 1967
28. Cohen S.M., E.M. Greenspan, M.J.Weiner, B.Kabakow: Triple Combination Chemotherapy of Desseminated Melanoma. Cancer 29, 1489-1495 (1972)

29. Cooper M., Y.Mishima: Increased in Vitro Radio-Sensitivity of Malignant Melanoma Induced by the in Vivo Administration of Chlorpromazine. Brit.J.Derm. 86, 491-494 (1972)
30. Dannenberg H.: Zur Frage der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und aromatischen Kohlenwasserstoffen und Aminen. In: Holzer H., A.W.Holldorf: Molekulare Biologie des malignen Wachstums. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966, S. 96-104
31. De Cosse J.J., L.S.Rogers: Influence of High Pressure Oxygen and Chemotherapy on the AMel 4 Hamster Melanoma. Cancer Res. 26, 287-292 (1966)
32. Deichmann G., T.E.Kluchareva: Immunological Determinants of Oncogenesis in Hamsters Infected with SV 40 Virus. Virology 24, 131-137 (1964)
33. Dunjic A.: Radiation Life Shortening Data. Strahlentherapie 138, 123-127 (1969)
34. Eddy B.E., G.E.Grubbs, R.D. Young: Tumor Immunity in Hamsters Infected with Adenovirus Typ 12 or Simian Virus 40. Proc.Soc.exptl.Biol.Med. 117, 575-579 (1964)
35. Edlich F.R., W.Rogers, C.V.DeShazo, J.B.Aust: Effect of Vasoactive Drugs on Tissue Blood Flow in the Hamster Melanoma. Cancer Res. 26, 1420-1424 (1966)
36. Eilber F.R., D.L.Morton, E.Carmack Holmes, F.C.Sparks, K.P.Ramming: Adjuvant Immunotherapy with BCG in Treatment of Regional Lymphnode Metastases from Malignant Melanoma. N.Engl.J.Med. 294, 237-240 (1976)
37. Epstein E.: Effect of Biopsy on the Prognosis of Melanoma. J.Surg.Oncol. 3, 251 (1971)

38. Epstein W.F., K.Fukujama: Light and Electron Microscopic Studies of a Transplantable Melanoma Associated with Virus-Like Particles. Cancer Res. 30, 1241-1245 (1970)
39. Epstein W.L., K.Fukujama, M.Benn, A.S.Keston, R.B. Brandt: Transmission of a pigmented melanoma in golden hamsters by a cell-free ultrafiltrate. Nature (Lond.) 219, 979-980 (1968)
40. Faraci R.P., L.Schour: Malignant Melanoma: Specific Immunity Induced by Bacillus Calmette-Guérin in BALB/c Mice. Science 185, 68-69 (1974)
41. Fortner J.G.: Spontaneous Tumors, Including Gastrointestinal Neoplasms and Malignant Melanomas in the Syrian Hamster. Cancer 10, 1153-1156 (1957)
42. Fortner J.G., Allen: Hitherto Unreported Malignant Melanomas in the Syrian Hamster: An Experimental Counterpart of the Human Malignant Melanoma. Cancer Res. 18, 98-104 (1958)
43. Fortner J.G.: The Influence of Castration on Spontaneous Tumorigenesis in the Syrian (Golden) Hamster. Cancer Res. 21, 1491-1498 (1961)
44. Friedlander G., J.W.Kennedy: Lehrbuch der Kern- und Radiochemie. Karl Thiemig München 1962, S. 183-193, E: Strahlenchemie
45. Gartmann H.: Therapie des malignen Melanoms. Dtsch. med.Wschr. 97, 1305-1307 (1972)
46. Gartmann H., H.Tritsch: Bedeutung feingeweblicher Befunde für die Prognose des Malignen Melanoms. Dtsch.med.Wschr. 97, 857-859 (1972)

47. Gillespie D., R.C.Gallo: RNA processing and the origin and evolution of RNA tumor viruses: RNA tumor viruses may originate from cell DNA though an alternative mode of RNA processing (paraprocessing). Science 183, 802-805 (1975)
48. Goldner H., A.J.Girardi, V.M.Larson, M.R.Hilleman: Interruption of the SV 40 Virus Tumorigenesis Using Irradiated Homologous Tumor Antigen. Proc.Soc.exptl. Biol.Med. 117, 851-857 (1964)
49. Goldring E.S., L.J.Grossmann, D.Krupnick, D.R.Cryer, J.Marmur: The Petite Mutation in Yeast. The Loss of Mitochondrial Desoxyribonucleic Acid during Induction of Petites Ethidiumbromide. J.mol.Biol. 52, 323-335 (1970)
50. Mc.Govern J., P.Russel: Pigment-Cell, Mechanismus in Pigmentation. Vol.1.Basel, Karger 1973, p.350
51. Greene H.S.N., E.K.Harvey: The Growth and Metastasis of Amelanotic Melanomas in Heterologous Hosts. Cancer Res. 26, 706-709 (1966)
52. Gutterman J.U., G.Mavligit, J.A.Gottlieb, M.A.Burgess, C.E.McBride, L.Einhorn, E.J.Freireich, E.M.Hersh: Chemoimmunotherapy of Disseminated Malignant Melanoma with Dimethyl Triazeno Imidazole Carboxamide and Bacillus Calmette-Guérin. N.Engl.J.Med. 291, 592 (1974)
53. Haneke E., W.Wohlrab, J.Peker: Kombinierte chirurgische und chemotherapeutische Behandlung von Fortner's amelanotischem Hamstermelanom AMel 3. Dermatologica 144, 92-96 (1972)
54. Harbers E.: Experimentelle Untersuchungen über das Zusammenwirken von Chemotherapeutika und Röntgenstrahlen. Krebsforschung und Krebsbekämpfung V, 182-188 (1964)

55. Heite H.J.: Prognose anhand der Absterbekurve in Abhängigkeit von Irration, Wachstum und Oberflächengestalt des Primärherdes. Arch.Klin.exp.Derm. 244, 200-205 (1972)
56. Hellriegel W.: Das klinische Bild und die Heilungsaussichten des malignen Melanoms. Strahlentherapie 111, 510-524 (1960)
57. Hellriegel W.: Strahlentherapeutische Fortschritte und Ergebnisse bei malignen Melanomen der Haut. Strahlentherapie 118, 213-225 (1962)
58. Huebner R.J., G.J.Todaro: Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 64, 1087-1094 (1969)
59. Hurwitz J., J.J.Furth, M.Malamy, M.Alexander: The Role of Desoxyribonucleic Acid in Ribonucleic Acid Synthesis. III. The Inhibition of the Enzymatic Synthesis of Ribonucleic Acid by Actinomycin D and Proflavine. Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 48, 1222-1230 (1962)
60. Ikonopisov R.L., M.G.Lewis, J.D.Hunter-Craig, D.C. Bodenheim, T.M Phillips, C.J.Cooling, J.Proctor, G.Hamilton Fairley, P.Alexander: Autoimmunization with Irradiated Tumor Cells in Human Malignant Melanoma. Brit.med.J. 3, 547 (1969)
61. Kretschmer H., R.Ludewig, K.Hambsch, W.Wohlrab, J.Peker: Therapieversuche mit Clostridium-butyricum-Sporen, Cyclophosphamid und Prednisolon am amelanotischen Melanom (AMel 3) des syrischen Goldhamsters. Dermatologica 143, 160-165 (1971)
62. Lerman L.S.: Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. J.Mol.Biol. 3, 18-30 (1961)

63. Lerman L.S.: Amino Group Reactivity in DNA-Amino-Acridine Complexes. *J.mol.Biol.* 10, 367-380 (1964)
64. Lerman L.S.: The Structure of the DNA-Acridine Complex. *Proc. Nat.Acad.Sci. (USA)* 49, 94-102 (1963)
65. Liebeskind D., K.C.Hsu, B.Erlanger, R.Bases: Immuno-reactivity to Antinucleoside Antibodies in X-Irradiated HeLa Cells. *Exptl. Cell Res.* 83, 399-405 (1974)
66. Lieven H., D.Skopal: Zur Strahlenempfindlichkeit des malignen Melanoms. *Strahlentherapie* 152, 1 - 4 (1976)
67. Lipkin G.: Sex Factors in Growth of Malignant Melanoma in Hamsters. In Vivo and in Vitro Correlation. *Cancer Res.* 30, 1928-1930 (1970)
68. Mishima Y.: Melanotic Tumors. In: *Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin*. Ed.: A.S.Zelickson, Philadelphia, Lea & Febiger 1967, p. 388-424
69. Mishima Y., M.Matunaka: Effect of Bleomycin on Benign and Malignant Cutaneous Tumors. *Acta dermat.-venerol.* 52, 211-215 (1972)
70. Miescher G.: Über Klinik und Therapie der Melanome. *Strahlentherapie* 102, 1 - 20 (1957)
71. Müller W., D.M.Crothers: Studies of the Binding of Actinomycin D and Related Compounds to DNA. *J.Mol.Biol.* 35, 251-290 (1968)
72. Muna N.M., S.Marcus, Ch.Smart: Detection by Immunfluorescence of Antibodies Specific for Human Malignant Melanoma Cells. *Cancer* 23, 88-93 (1969)

73. Paoletti J.: Resonance Energy Transfer Between Ethidium-bromide Molecules Bound to Nucleic Acids; Does Intercalation Wind or Unwind the DNA-Helix? *J.mol.Biol.* 59, 43-62 (1971)
74. LePequí J.B., C.Paoletti: A Fluorescent Complex Between Ethidiumbromide and Nucleic Acids; Physical Chemical Characterisations. *J.mol.Biol.* 27, 87-106 (1967)
75. Phillips T.M., M.G.Lewis, R.L.Ikonopisov, R.C.Nairn, G.Hamilton Fairley, D.C.Bodenheim, P.Alexander: Tumor Specific Antibodies in Human Malignant Melanoma and Their Relationship to Extent of Disease. *Brit.med.J.* 3, 547-552 (1969)
76. Piller S.: 10-Jahresstatistik der Strahlenbehandlung von Karzinomkranken mit Kobalt 60 in der Privatpraxis. *Strahlentherapie* 144, 541- 565 (1972)
77. Prévôt H.jr., W.A.Linden, S.Wehebe, A.Lügger: In Vitro Untersuchungen an Säugetierzellen über die Strahlenschutzwirkung von Melanin. *Strahlentherapie* 140, 753-756 (1970)
78. Primack A., D.Ohavel, W.M.Jovan, F.Kiryabwire, C.L.Vogel: Clinical Trials of Combination Chemotherapy with BCNU and Vincristine in the Treatment of Malignant Melanoma in Uganda. *Cancer* 31, 337-341 (1973)
79. Rawles M.E.: Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol.Zool.* 20, 248-266 (1947)
80. Richardson J.P.: Mechanism of Ethidiumbromide Inhibition of RNA-Polymerase. *J.mol.Biol.* 78, 703-714 (1973)

81. Richardson J.P.: Effect of Ethidiumbromide on Transcription of Linear and Circular DNA Templates. J.mol. Biol. 78, 715-720 (1973)
82. Ringleb D.: Untersuchungen zum Verständnis der Problematik radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung. Strahlentherapie 135, 597-601 (1968)
83. Rohde B., A.Wiskemann: Über das Wachstum röntgenbestrahlter Melanomalignome in der Gewebekultur und im Transplantationsversuch. Strahlentherapie 123, 534-544 (1964)
84. Salomon T., H.Storck: Über die Sensibilität des Hamstermelanoms gegenüber Röntgenstrahlen, Kälte, Zytostatika und immunologischen Einflüssen. Arch.klin.exp .Derm.216, 161-185 (1963)
85. Savlov E.D., T.C.Hall, R.A.Oberfield: Intra-Arterial Therapy of Melanoma with Dimethyl Triazeno Imidazole Carboxamide. Cancer 28, 1161-1164 (1971)
86. Scherer E., L.Magnus, H.B.Makoski: Neue radiologisch-chirurgische Rezepte bei der Behandlung des Melanomalignoms. Fortschr.Röntgenstr. 118, 174-178 (1973)
87. Schlorm J., S.Spiegelman: Simultaneous detection of reverse transcriptase and high molecular weight RNA unique to the oncogenical RNA viruses. Science 174, 840-843 (1971)
88. Sinner W.: Beitrag zur Klinik und Therapie der malignen Melanome. (Züricher Erfahrungen an 145 Fällen 1919 - 1961). Strahlentherapie 117, 18-62 (1962)
89. Stäubli N., P. Loustalot: Electron Microscopy of Transplantable Melanotic and Amelanotic Hamster Melanomas. Cancer Res. 22, 84-88 (1962)

90. Stein G.: Vermeidung eines Kombinationseffektes in der kombinierten chirurgisch-radiologischen Behandlung von malignen Hauttumoren. Strahlentherapie 128, 347-350 (1965)
91. Storck A.: Zur Klinik und Therapie des malignen Melanoms. Hautarzt 21, 187 (1970)
92. Temin H.M.: The provirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. J.Natl. Cancer Inst. 46, III-IV (1971)
93. Trott K.-R.: Strahlenbiologische Grundlagen der Strahlentherapie unter besonderer Berücksichtigung der Therapie mit Korpuskularstrahlen. Strahlentherapie 148, 451-462 (1974)
94. Waring M.J.: Complex Formation Between Ethidiumbromide and Nucleic Acids. J.mol.Biol. 13, 269-282 (1965)
95. Weissleder H., P.Pfannenstiel: Endolymphatische Therapie beim Melanom mit Radioisotopen. Hautarzt 23, 234 (1972)
96. Wohlrab W., J.Peker: Über die Eignung von Transplantationsbedingungen des AMel 3 Hamstermelanoms zur Beurteilung von Einflüssen auf das Tumorstadium. Dermatologica 143, 160-165 (1971)
97. Wolf H.: Der Einfluß von DNS-interkalierenden Farbstoffen und Röntgenstrahlen auf das Hamstermelanom AMel 3. Ein experimenteller Beitrag zur Behandlung des malignen Melanoms. Inaugural-Dissertation 1977, Universität München

98. Wolff H.H., B.-R. Balda, G.D.Birkmayer, O.Braun-Falco:
Zur Ultrastruktur des Hamstermelanoms AMel 3 von Fortner.
Arch.Derm.Forsch. 240, 192-203 (1971)
99. Wolf-Jürgensen P., A.W.Kopf, G.Lipkin, R.S. Bart:
Influence of Antilymphocyte Serum on Malignant Melanoma.
J.Invest.Derm. 51, 441-444 (1968)
100. Zylber E.: Selective Inhibition of the Synthesis of
Mitochondria-Associated RNA by Ethidiumbromide.
J.mol.Biol. 44, 195-204 (1969)
101. Zylber E.: Mitochondria-Associated 4S-RNA-Synthesis
Inhibition by Ethidiumbromide. J.mol.Biol. 46, 201-
204 (1969)

Besonderer Dank soll Herrn Priv.Doiz.Dr.B.-R. Balda für die Problemstellung und Betreuung während der Arbeit zuteil werden. Mit seiner Unterstützung konnten die Versuche an der Dermatologischen Klinik der Universität München und am Strahlenbiologischen Institut erfolgreich beendet werden.

Lebenslauf

Am 9.12.1950 wurde ich in Landshut geboren. Mein Vater, Dr.jur.Heinrich Stöß, geb.1903 in Zwickau (Sachsen), verstarb 1973 in Aschau. Meine Mutter, Edeltraud Stöß, geb. Feilmeier, 1919 in München, lebt in Aschau. Meine Schwester, Rosmarie Dirnsteiner, geb.1947 in Zwickau, ist Studienrätin in Landshut.

Die Volksschule besuchte ich von 1956 bis 1960 in Landshut. 1969 legte ich in Regensburg die Reifeprüfung ab. 1o Semester Zahnmedizin belegte ich anschließend an der Universität München, wo ich auch nach erfolgreichem Staatsexamen die Bestallung als Zahnärztin erhielt.

Von 1975 bis 1977 arbeitete ich als Assistentin in Prien. Im März 1977 wurde mir die Kassenzulassung für Bernau gewährt. Dort führe ich seit April 1977 eine eigene Zahnarztpraxis.

Aschau, 4.10.77

Gabriele Stöß

Gabriele Stöß

